Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an zwei fischpathogenen Rhabdoviren (VHS-V und SVC-V)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
AXEL DEUTER
aus Gelsenkirchen

1984

gedruckt bei H.- J. Köhler Tübingen

Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an zwei fischpathogenen Rhabdoviren (VHS-V und SVC-V)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
AXEL DEUTER
aus Gelsenkirchen

1984

gedruckt bei H.- J. Köhler Tübingen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1984

Dekan: Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter: Professor Dr. Evamarie Sander
2. Berichterstatter: Professor Dr. O.C. Straub

Ich möchte mich beim Präsidenten der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, Herrn Präsident und Prof. Dr. G. Wittmann dafür bedanken, daß er mir das Arbeiten in der Bundesforschungsanstalt ermöglicht hat.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. E. Sander für ihren Rat und ihre Unterstützung, die sie mir jederzeit gewährte.

Herrn Dr. P.J. Enzmann möchte ich besonders danken, da er nicht nur die finanziellen und organisatorischen Voraussetzungen schuf, sondern auch durch seine wertvollen Anregungen und konstruktive Kritik sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Kr. Leinenbach und Frau I. Fabian danke ich für ihre Einsatzbereitschaft bei der Bewältigung aller anfallenden Probleme, Herrn R. Straub und Herrn P. Schröter für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen sowie Frau C. Dicker für die Geduld und Sorgfalt bei der Reinschrift des Manuskripts.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle	1
1.2	Die Frühlingsvirämie der Karpfen (spring viraemia of carp)	3
1.3	Rhabdoviridae	5
1.3.1	Allgemeine Beschreibung der Rhabdoviridae	5
1.3.2	Virusstruktur	6
1.3.3	Replikationszyklus	7
1.3.4	Systematische Einordnung von VHS-V und SVC-V	8
2.	PROBLEMSTELLUNG	11
3.	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Materialien	13
3.1.1	Verwendete Geräte	13
3.1.2	Chemikalien und sonstige Materialien	14
3.1.3	Medien, Puffer, Lösungen	15
3.1.4	Virusstämme	19
3.1.5	Zellkulturen	19
3.2	Methoden	20
3.2.1	Zellvermehrung	20
3.2.2	Virusvermehrung	21
3.2.3	Virusreinigung I und Viruskonzentrierung I	22

3.2.4	Virusreinigung II und Viruskonzentrierung II	22
3.2.5	Dichtegradienten-Zentrifugation	23
3.2.5.1	Gleichgewichts-Zentrifugation	23
3.2.5.2	Gleichgewichts-Zentrifugation in Percoll	24
3.2.5.3	Gleichgewichts-Zentrifugation in Metrizamid	25
3.2.6	Radioaktive Markierungen	25
3.2.6.1	Prinzip der externen Markierung von Proteinen mit ^{125}I	25
3.2.6.1.1	Markierung mit der ^{125}I-Chloramin-T-Methode	27
3.2.6.2	Metabolische Markierung mit L-[^{75}Se]-Selenmethionin	28
3.2.6.2.1	Prinzip der metabolischen Markierung	28
3.2.6.2.2	Durchführung der metabolischen Markierung	29
3.2.7	Messung der Gammastrahlung	30
3.2.8	Autoradiographie	30
3.2.9	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	31
3.2.9.1	Prinzip der PAGE	31
3.2.9.2	Röhrchengel-Elektrophorese	33
3.2.9.2.1	Auswertung der Röhrchengel-Elektrophorese	35
3.2.9.3	Diskontinuierliche Flachgel-Elektrophorese	36
3.2.9.4	Doppelgradienten-Gelelektrophorese	37
3.2.9.4.1	Theorie der diskontinuierlichen Gelelektrophorese	38
3.2.9.4.2	Herstellung der Doppelgradienten-Gele	40
3.2.10	Untersuchungen an Virusproteinen	40
3.2.10.1	Die limitierte Proteolyse und die Analyse der resultierenden	40

	Peptidmuster in der Doppelgradienten-Gelelektrophorese	
3.2.10.2	Verwendete Proteasen	41
3.2.10.3	Durchführung der limitierten Proteolyse	42
3.2.11	Herstellung von Immunseren	43
3.2.11.1	Serumgewinnung	43
3.2.11.1.1	Gewinnung von Anti-VHS-V und Anti-SVC-V-Immunseren in Kaninchen	43
3.2.11.1.2	Gewinnung von Anti-VHS-V-Immunserum in der Ziege	43
3.2.11.1.3	Gewinnung von Immunseren gegen spezifische Virusproteine	43
3.2.11.2	Serumreinigung	44
3.2.12	Radioimmun-Präzipitation (RIP)	44
3.2.12.1	Vorbereitung der RIP	44
3.2.12.2	Durchführung der RIP	45
3.2.13	Gegenstrom-Immunelektrophorese	45
3.2.14	Elektro-Immundiffusion (nach Laurell)	46
4.	ERGEBNISSE	48
4.1	Vergleichende Dichtebestimmung des VHS-V und SVC-V in verschiedenen Dichtegradienten	48
4.1.1	Verwendete Gradienten und Auswertung der Dichteläufe	48
4.1.2	Zusammenfassung der ermittelten Dichtewerte	52
4.2	Molekulargewichtsbestimmung der Virusproteine im diskontinuierlichen Polyacrylamid-Flachgel	57
4.3	Röhrchengel-Elektrophorese	61

4.4	Doppelgradienten-Gelelektrophorese	62
4.5	Die Peptidmuster der Virusproteine nach der limitierten Proteolyse	66
4.6	Radioimmun-Präzipitation	73
4.7	Gegenstrom-Immunelektrophorese mit VHS-V und SVC-V	75
4.8	Elektro-Immundiffusion nach Laurell	77
5.	DISKUSSION	80
6.	ZUSAMMENFASSUNG	89
7.	LITERATURVERZEICHNIS	91

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
Ci	Curie
DEAE	Diethylaminoethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	Epithelioma papulosum carpio
FHM	Fathead Minnow
Freon	Trifluortrichlorethan
Gew.-%	Gewichtsprozent
IBW	Infektiöse Bauchwassersucht
i.d.	intradermal
IDP	Infectious Dropsy of Carp
i.m.	intramuskular
kd	kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.f.u.	plaque-forming units
RIP	Radioimmun-Präzipitation
RNP	Ribonukleoprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
RVC	Rhabdovirus carpio
SVC-V	Spring Viraemia of Carp Virus
SW	Schwingbecher-Rotor
TEMED	Tetramethylendiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TPCK	Tosyl-L-Phenlalanin-Chlormethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vol-%	Volumenprozent
UpM	Umdrehungen pro Minute
VHS-V	Virus der hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VT	Versen-Trypsin
ZPE	Zytopathischer Effekt

1. EINLEITUNG

Durch virusbedingte Fischkrankheiten erstehen den Nutzfischzüchtern in fast allen europäischen Ländern erhebliche Verluste, da diese Krankheiten infolge von kontaminierten Besatzfischen oder durch Einschleppung der Erreger seuchenhaft auftreten. Aus diesem Grunde wurden die virusbedingten Fischkrankheiten in das am 28.03.1980 in Kraft getretene Tierseuchengesetz (Anonym, a, 1980) der Bundesrepublik Deutschland einbezogen. Die bisher freiwilligen Bekämpfungsmaßnahmen sind durch entsprechende Verordnungen geregelt (Anonym, b, c, 1982). Unter diese Verordnungen fallen zum einen die "virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle" (Salmo gairdnerii) und zum anderen die "Frühlingsvirämie der Karpfen" (Cyprinus carpio).

1.1 Die virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle

Die virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle (Salmo gairdnerii) ist 1938 zum ersten Mal unter der Bezeichnung "infektiöse Nierenschwellung" von Schäperclaus beschrieben worden.

Nachdem diese Krankheit 1950 in einer Teichwirtschaft in der Nähe des dänisch-jütländischen Dorfes Egtved seuchenhaft auftrat, wurde der mutmaßliche Erreger Egtved-Virus benannt. Jensen gelang es dann 1963, dieses Virus zu isolieren, welches schließlich von Zwillenberg (1965) zweifelsfrei als Rhabdovirus identifiziert wurde und seitdem als VHS-V (Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie) bezeichnet wird. Das Virus ruft eine systemische Erkrankung hervor, wobei Fische aller Altersstufen befallen werden können; die Mortalität kann bis zu 100% betragen. Im Verlauf der

Bestands-Erkrankung können folgende Stadien beobachtet werden (Klingler, 1957, 1958; Ghittino, 1967):

a) die akute Form:
In diesem Stadium treten innerhalb einer kurzen Zeitspanne hohe Verluste auf. Die auftretenden Symptome sind: mäßige Dunkelfärbung der Fische, Glotzaugen (Exophthalmus), blasse Kiemen, punkt- bis streifenförmige Blutungen in Organen, Muskulatur und an den Flossenansätzen, Anschwellung des Leibes durch wässrig-blutige Flüssigkeitsansammlung in der Leibeshöhle (Aszites). Die Fische stehen apathisch in der Nähe der Teich- beziehungsweise Beckenränder.

b) die "chronische" oder subakute Form:
Diese Form der Krankheit tritt unabhängig von der akuten Form auf. Als Symptome können starker Exophthalmus, Anämie, charakterisiert durch grauweiße Kiemen, und ein gelblicher After beobachtet werden. Die Fische neigen zu Apathie und führen plötzliche, drehförmige Schwimmbewegungen um die Körperlängsachse aus. Die Verlustraten sind niedriger als bei der akuten Form.

c) die "nervöse" Endform (Ataxieform):
Diese Schlußphase einer Bestandserkrankung weist die geringsten Verlustraten im befallenen Bestand auf. Die blitzartigen, spiraligen Schwimmbewegungen nehmen zu, wogegen die übrigen Symptome kaum noch vorhanden sind.

Alle genannten Symptome können jedoch zum Teil fehlen, fließend sein oder kombiniert auftreten. Die VHS-Ausbrüche erfolgen gehäuft im Frühjahr und Herbst bei zunehmender Wassererwärmung, beziehungsweise -abkühlung. Der Wendepunkt um 7-11°C ist besonders

kritisch; die Befallsraten erreichen zum Beispiel in Süddeutschland 60 bis 90%. Genaue Daten über die Verbreitung des Virus können nach Inkrafttreten der oben genannten Verordnungen erst in einigen Jahren erwartet werden.

Ghittino (1967) berichtet, daß die Übertragung durch das Wasser stattfindet. Bellet (1958) und Zwillenberg (1968) diskutieren die Übertragung des Virus durch den Flagellaten Hexamita salmonis, wofür aber bisher noch keine eindeutigen Beweise vorliegen.

Außer bei der Regenbogenforelle ist das Virus in der Bachforelle (Salmo trutta), im Bachsaibling (Salveninus fontinalis), im Hecht (Esox lucius) und bei der Äsche (Thymallus thymallus) beobachtet worden.

Experimentell lassen sich außerdem der Lachs (Salmo salar), der Goldfisch (Carassius auratus gibelio), die Goldforelle (Salmo aguabonita) sowie Regenbogenforellen-Hakenlachs-Hybriden (Salmo gairdnerii x Oncorhychus kisutch) infizieren (Wizigmann et al., 1980; Meier und Joergensen, 1980).

1.2 Die Frühlingsvirämie der Karpfen (spring viraemia of carp)

Die Frühlingsvirämie der Karpfen wurde ursprünglich als "infektiöse Bauchwassersucht" (IBW beziehungsweise "infectious dropsy of carp" (IDP)) bezeichnet und erstmals von Schäperclaus (1954) beschrieben. Als Erreger wurden verschiedene gramnegative Bakterien diskutiert. Elf Jahre später gelang es Tomasec und Fijan (1965), mit bakterienfreien Filtraten von IBW-Karpfen zytopathische Effekte in Karpfennieren-Explantat- Kulturen zu erzielen. Die daraus nach

mehreren Passagen gewonnenen Isolate erzeugten in gesunden Karpfen Symptome der IBW.

1971 isolierte Fijan schließlich aus an IBW erkrankten Karpfenbeständen ein Virus, welches aufgrund seiner Morphologie als "Rhabdovirus carpio" (RVC) bezeichnet wurde, und nach der heutigen internationalen Nomenklatur den Namen "spring viraemia of carp virus" (SVC-V) trägt.

Dieses Virus konnte dann auch unter anderem von Rudikow (1975) in der UdSSR und Békési (1979) in Ungarn isoliert und als SVC-V identifiziert werden.

Man unterscheidet heute drei verschiedene Formen der IBW, die jeweils verschiedene Erreger haben (Schäperclaus, 1979):

a) Die Geschwürform der IBW oder Erythrodermatitis der Karpfen, mit dem Spirillum Aeromonas salonicida als Erreger.

b) Die chronische Form der IBW, die von Aeromonas punctata hervorgerufen wird.

c) Die akute Form der IBW, die Frühlingsvirämie der Karpfen, die durch das SVC-V verursacht wird.

Neben den äußeren Symptomen wie Dunkelfärbung, Exophthalmus, Blutungen in Kiemen und Haut, hervorgetriebenem, entzündeten After und abnormalen Schwimmbewegungen treten strich- bis punktförmige Blutungen in der Muskulatur, Leber, Niere, Herz und Schwimmblase auf. Die Tiere sind anämisch und in der Regel ist Aszites in der Bauchhöhle vorhanden. Zu beachten ist, daß, wie bei der VHS-V, alle Symptome fließend sind oder fehlen können.

Die optimale Wassertemperatur für den Ausbruch der Frühlingsvirämie liegt bei 16-17°C, wobei Verluste bis zu 100% auftreten. Das SVC-V befällt alle Altersklassen, jedoch besonders junge Fische bis zu drei Jahren. Neben Überträgerfischen und infiziertem Wasser werden die Karpfenlaus (Argulus foliaceus) von Pfeil-Putzien (1978) sowie die Fruchtfliege (Drosophila melanogaster) von Bussereau et al. (1975) als mögliche Vektoren beschrieben.

1.3 Rhabdoviridae

Wie schon oben erwähnt, sind das SVC-V und das VHS-V taxonomisch der Familie Rhabdoviridae zuzuordnen. Der Fisch als Wirbeltier ist hinsichtlich der Evolution von den bisher untersuchten Wirbeltieren, die von Rhabdoviren befallen werden können (Säugetiere), weit entfernt. Die Tatsache, daß Rhabdoviren auch in Fischen vorkommen, gibt Anlaß zu der Überlegung, ob die in den Fischen vorkommenden Rhabdoviren eine serologische Verwandtschaft zeigen und damit von einem gemeinsamen Virus abstammen, oder ob die Anpassung an den poikilothermen Organismus mehrfach erfolgt ist.

1.3.1 Allgemeine Beschreibung der Rhabdoviridae

Rhabdoviridae (griech., Rhabdos = Stäbchen, Stab) sind ubiquitär, das heißt in Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen verbreitet. Man kennt die bacilliforme Struktur, die hauptsächlich bei phytopathogenen Rhabdoviren auftritt, und eine geschoßförmige Struktur (bullet-shaped), die vorwiegend bei tierpathogenen Viren vorkommt (Wagner, 1975). Die durchschnittliche

Größe beträgt 175nm x 70nm. Jedoch treten auch aberrante, längere und kürzere Formen auf, so zum Beispiel beim VHS-V die längere Form (Enzmann, 1981) und beim VSV (vesicular stomatitis virus) wesentlich kürzere Formen, die T-Partikel (truncated), welche nicht infektiös sind und weniger RNS enthalten als die B-Partikel (bullet-shaped) (Horzinek, 1975).

1.3.2 Virusstruktur

Abbildung 1 zeigt eine modifizierte Darstellung eines Rhabdovirus (Deuter, 1981).

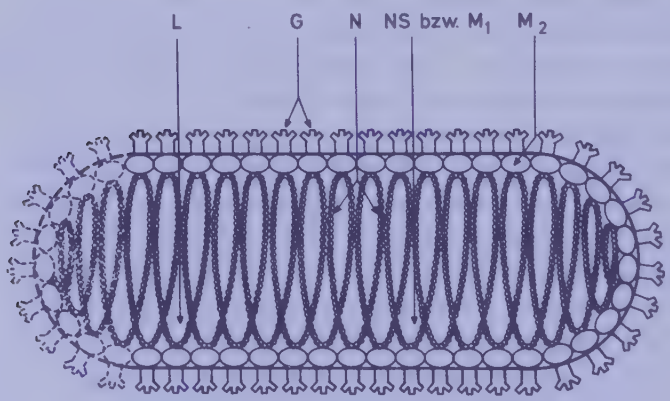


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Rhabdovirus

Das Virus besteht aus drei Komponenten, der Virusmembran, den Nukleokapsidproteinen und dem RNS-Minus-Einzelstrang. Die Viruspoteine lassen sich wie folgt charakterisieren:

1. L-Protein = Large-Protein, assoziiert mit dem Nukleokapsid

als sehr labil.

Die osmotischen Belastungen führten zu einer teilweisen Freisetzung des RNP, das heißt zu einem Zerfall des Virions. Es wurde deshalb nach einer schonenderen Reinigungsmethode gesucht.

Durch die Verwendung von Percoll und Metrizamid, Dichtemedien mit inerten Eigenschaften und geringer Osmolalität, gelang es, bessere Ergebnisse bei der Virusreinigung zu erhalten.

In Tabelle 3 sind zusammenfassend die Ergebnisse der Dichtebestimmungen in allen drei Dichtemedien aufgeführt. Die in Sucrosegradienten ermittelten Dichtewerte stimmen mit denen in der Literatur überein. So berichtet de Kinkelin (1972) über eine Dichte für das VHS-V von 1,14-1,16 g/cm^3 und Lenoir (1973) ebenfalls 1,14-1,16 g/cm^3 für das SVC-V. Literaturangaben über die Verwendung von Percoll und Metrizamid liegen nicht vor. Für die weiteren biochemischen und serologischen Untersuchungen wurden nur noch Metrizamidgradienten verwendet.

Die in der diskontinuierlichen Flachgel-Elektrophorese ermittelten Molekulargewichte für die viralen Strukturproteine sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus mehreren Proteintrennungen in Polyacrylamid-Gelen, wobei der Vergleich VHS-V mit SVC-V jeweils im selben Gel erfolgte, so daß identische Bedingungen vorlagen. Nur so ist ein direkter Vergleich der Molekulargewichte bei den Strukturproteinen beider Virusarten möglich. Wie die Tabelle zeigt, sind die Unterschiede zwischen SVC-V und VHS-V nicht so groß, wie aus den Literaturwerten zu erwarten war. Die Bezeichnung der Strukturproteine (Abb. 7) mit L, G, N, M_1 und M_2 beim VHS-V und mit L, G, N, (NS_1), NS_2 und M

(auf das NS_1 wird weiter unten noch näher eingegangen) erfolgte in Anlehnung an Matthews (1982). Somit könnte vorerst das VHS-V dem Genus Lyssavirus und das SVC-V dem Genus Vesiculovirus der Familie Rhabdoviridae zugeordnet werden. Eine endgültige Zuordnung kann jedoch erst erfolgen, wenn serologische Kreuzreaktionen mit bereits klassifizierten Vertretern der beiden Genera nachgewiesen werden können.

Im folgenden wird auf weitere methodische Arbeiten eingegangen, die notwendig waren, um die aufgetretenen Probleme zu lösen.

Markierungen mit dem Gammastrahler ^{75}Se, wie sie bei den radioaktiven Markierungen der Strukturproteine beider Virusarten angewendet wurden, haben gegenüber Markierungen mit Betastrahlern wie zum Beispiel ^{35}S, einige Vorteile. Die Gammaprobe kann direkt im Gamma-Zähler gemessen werden; dadurch entfällt das Zupipettieren chemischer Reagenzien, die zur Vorbereitung der Messung von Betastrahlung notwendig sind, sowie die Zugabe von Szintillationsflüssigkeit. Es werden zum einen zusätzliche Arbeitsgänge eingespart und zum anderen kann nach der Messung der Gammastrahlung die Probe für weitere Versuche verwendet werden.

In Verbindung mit der Röhrchengel-Elektrophorese wird ein weiterer Vorteil deutlich. Die Abbildung 7 zeigt ein radioaktiv markiertes N-Protein aus einem Röhrchengel, welches in einem Flachgel re-elektrophoretisiert wurde. Die Röhrchengel-Elektrophorese kann also bei Anwendung von Markierungen mit Gammastrahlern als präparative Methode für die Isolierung markierter Virusproteine verwendet werden, wobei die erhaltenen Polypeptide bei weiteren Versuchen eingesetzt werden können.

Aufgrund dieser Befunde würde sich die Familie der Rhabdoviridae auf das Genus Vesiculovirus und die Gruppe der Pflanzen-Rhabdoviren reduzieren.

Nach den bisher bekannten morphologischen Daten (Tabelle 1) werden dem SVC-V die Proteine L, G, N, NS und M und dem VHS-V die Proteine L, G, N, M_1 und M_2 zugeschrieben. Infolge dieser Proteinzusammensetzung müßte das SVC-V dem Genus Vesiculovirus und das VHS-V dem Genus Lyssavirus zugeordnet werden.

	Protein	L	G	N	NS	M	M_1	M_2	Autor
a	VSV	190	69	50	40-45	29	–	–	Wagner 1972
	SVC-V	≥ 150	70	40	–	19	–	–	Lenoir 1973
	SVC-V	> 150	82	52	44	23	–	–	Hill 1975
	SVC-V	160	88	52	43	23	–	–	Sokol 1978
	SVC-V	180	76-77	46-47	52-53	25-27	–	–	Clerx 1978
	SVC-V	160	85	45	50	21	–	–	Roy and Cewley 1978
	SVC-V	190	80	42	–	21	–	–	Lenoir 1975
b	VHS-V	190	80	38	–	–	25	19	Lenoir 1975
	VHS-V	> 150	86-90	62	–	–	38	33	Hill 1975
	VHS-V	157	74	41	–	–	21.5	19	Mc Allister 1975

Tab. 1: Daten der bisher bekannten Molekulargewichts-Bestimmungen von 1a) SVC-V 1b) VHS-V

Die angegebenen Molekulargewichte schwanken erheblich von Autor zu Autor, so werden zum Beispiel beim G-Protein des SVC-V Molekulargewichte von 69-88kd angegeben und beim N-Protein des VHS-V Molekulargewichte von 38-62 kd.

Unter anderem aufgrund der beschriebenen Unstimmigkeiten konnten die beiden Virusarten VHS-V und SVC-V bisher noch nicht endgültig eingeordnet werden. Sie werden daher bisher nur als wahrscheinliche Mitglieder der Familie Rhabdoviridae aufgeführt (Matthews, 1982).

2. PROBLEMSTELLUNG

Durch die Aufnahme der viralen hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle und der Frühlingsvirämie der Karpfen in das Tierseuchengesetz sind staatliche Bekämpfungsmaßnahmen möglich geworden.

Grundlagen für die Bekämpfung sind zum einen schnelle und sensitive Nachweismethoden für die Erreger, beziehungsweise für virale Antigene, wobei die Herstellung des dazu notwendigen Immunserums von entscheidender Bedeutung ist, und zum anderen die Kenntnis der biochemischen Daten der Viren.

Enzmann et al. konnten 1981 aus infizierten Zellen durch Radioimmun-Präzipitation der viralen Polysomen mit Hilfe eines Anti-VHS-V-Immunserums eine m-RNS von VHS-V und SVC-V isolieren, deren Größe darauf schließen ließ, daß es sich dabei um die m-RNS für das L-Protein handelt. Dieser Befund sprach für eine mögliche Verwandtschaft zwischen beiden Virusarten.

Bei verschiedenen serologischen Tests konnten immer wieder schwache Kreuzreaktionen zwischen beiden Virusarten festgestellt werden (Deuter, 1981), die jedoch schlecht reproduzierbar waren. In Bezug auf das VHS-V muß erwähnt werden, daß alle an der Forschung mit diesem Virus beteiligten Laboratorien die Schwierigkeiten betonen, die sich bei der Herstellung eines guten Immunserums gegen dieses Virus ergeben (Ahne, 1981).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, zu klären ob, und wenn ja, inwieweit das VHS-V und das SVC-V miteinander verwandt sind. Hierzu war ein direkter Vergleich beider Virusstämme notwendig, um die schon in der Einleitung unter 1.3.4 beschriebenen Unterschiede

in den Versuchsergebnissen von vornherein auszuschließen.

Vorbedingung hierzu war die Virusproduktion auf geeigneten Zell-Linien, die Virusisolierung und -reinigung, sowie die Herstellung von Immunseren. Für den biochemischen Vergleich galt es, zunächst die Proteinzusammensetzung von VHS-V und SVC-V zu ermitteln und die nachgewiesenen Proteine zu isolieren.

Mit Hilfe des limitierten proteolytischen Abdaus der einzelnen Virusproteine beider Virusarten sollte aufgrund ähnlicher oder gleicher Proteinbruchstücke eine Verwandtschaft beziehungsweise der Verwandtschaftsgrad zwischen VHS-V und SVC-V ermittelt werden.

Schließlich galt es, neben den biochemischen auch die serologischen Verwandtschaftsbeziehungen aufzuklären.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Geräte

Homogenisator:	Braun, Melsungen
Spannungsgeber:	- Power supply, Mod. GT 500; WTW, Weilheim - LKB Power supply, Typ 3371 D; LKB-Produkter AB, Stockholm
Kühlgerät (Elektrophorese):	Colora; Colora Meßtechnik GmbH, Lorch
Gamma-Zähler:	Berthold MAG 312 mit Teletype Model 43
Zentrifugen:	- Beckman L3 - 50 UZ - Stock, Baujahr 1956, max. 3000 UpM - Eppendorf, Tischzentrifuge
Umgekehrtes Mikroskop:	Leitz Diavert
Laminar-Flow-Arbeitsbank:	Typ D4242 MRF; Ceag Shirp, Reinraumtechnik
Kühlbrutschränke, begasbar:	- Assab, Hannover - Heraeus, Hanau
Refraktometer:	Zeiss
Elektrophoresekammer für Flachgele:	Eigenbau der feinmechanischen Werkstatt
Elektrophoresekammer für Röhrchengele:	Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim
Gelkammer für Immunelektrophoresen:	Behring-Werke, Marburg
Gradientenmischer:	LKB, Bromma
Schlauchpumpe:	Miniplus 2 Gilson

Laser Densitometer:	2202 Ultroscan LKB, Bromma Apple IIe for Ultrascan Interface and Software Package LKB, Bromma	
Thermoschreiber:	Epson FX-80	Epson, Düsseldorf

3.1.2 Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien, die keinen besonderen Vermerk tragen, wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Agarose, hohe Elektroendosmose	Seakam, Marine Colloide, Rockland, Main, USA
Agarose, niedrige Elektroendosmose	Seakam, Marine Colloide, Rockland, Main, USA
Ammoniumpersulfat, p.a.	Serva, Heidelberg
Acrylamid, reinst	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau Na-Salz, reinst	Serva, Heidelberg
Bykomycin	Byk Gulden, Konstanz
^{14}C-methylierte niedermolekulare Proteinmischung	Buchler, Braunschweig
Chloramin-T (N-Monochlor-derivat von P-Toluolsulfonamid	Fluka, Neu-Ulm
Elektrophorese-Eichkit für hochmolekulare Proteine	Pharmacia, Freiburg
Fetales Kälberserum, Mycoplasmen getestet	Seromed, München
Freon 113	Serva, Heidelberg
^{125}I (Natriumiodid)	Buchler, Braunschweig
L-[^{75}Se]-Selenmethionin	The Radiochemical Centre, Amersham, (Buchler, Braunschweig)
Metrizamid, reinst	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst	Serva, Heidelberg

Penicillin	Grünenthal, GmbH
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia, Freiburg
Sephadex Fertigsäule, G-25M, PD-10	Pharmacia, Freiburg
Serva Blau G, reinst	Serva, Heidelberg
N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin, reinst (TEMED)	Serva, Heidelberg
TPCK-Trypsin-Sepharose CL-4B	Pierce, Rockford, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tylosintartrat-Lösung	Serva, Heidelberg
Protease V8 (S.aureus)	Miles, Elkhart, USA
Filme: Kodak X-No-screen, Kodak Direct Exposure Film	

3.1.3 Medien, Puffer, Lösungen

MEM, Minimal Essential Medium nach EAGLE (1955)

NaCl	6,4	g
KCL	0,4	g
$CaCl_2$	0,2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	g
$NaH_2PO_4.H_2O$	0,2	g
Glutamin	0,292	g
Glucose	4,5	g
Eisennitrat	0,1	g
mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen		
$NaHCO_3$	2,75	g
Inositol	3,5	g
Vitamine	4,0	ml (Difco, 1g in 20 ml Aqua bidest.)
Aminosäuren	20,0	ml (Difco, Mischung)
Phenolrot	0,016	g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen		
(Rezept Serva, Heidelberg)		

VM 3a-T (SCHWÖBEL und SIEDENTOPF, 1961)

NaCl	8,0	g
KCl	0,3	g
$CaCl_2$	0,24	g
$MgCl_2$	0,2	g
$NaHCO_3$	2,0	g
Glucose	2,0	g
Tris	3,634	g
Phenolrot	0,016	g

Die Substanzen werden der Reihe nach in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit HCL, konz. auf 7,6 eingestellt.

Versen-Trypsin (VT)

NaCl	8,0	g
KCl	0,2	g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1,15	g
KH_2PO_4	0,2	g
Trypsin	1,25	g
Versen	1,25	g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Phosphat-gepufferte, isotonische Salzlösung (PBS)
(Phosphate Buffered Saline, DULBECCO und VOGT, 1954)

NaCl	8,0	g
KCl	0,2	g
$CaCl_2$	0,1	g
$MgCl_2.6H_2O$	0,1	g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1,12	g
KH_2PO_4	0,2	g

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Tris-EDTA-NaCl (TEN-Puffer)

Tris	6,075	g

EDTA 0,186 g
NaCl 5,8 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und mit einnormaler HCl auf pH 7,5 einstellen.

Barbitalpuffer, pH 8,2

Barbital-Natrium (5,5-Diethylbarbitursäure-Natriumsalz) 8,92 g
Natriumacetat $3H_2O$ 5,89 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und den pH-Wert mit HCl, konz. auf 8,2 einstellen.

Barbitalpuffer, pH 8,6

Barbital-Natrium 4,12 g
Barbital (5,5-Diethylbarbitursäure) 0,8 g
mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und den pH mit HCl, konz. auf 8,6 einstellen.

Lösungen und Puffer für die diskontinuierlichen Gelelektrophoresen

Elektrodenpuffer

Glycin 14,413 g
SDS 1,0 g
Tris 3,028 g
auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen und den pH mit HCl, konz. auf 8,3 einstellen.

Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid 30% (Gew.-%)
Bis 0,8% (Gew.-%)

Tris-Puffer pH 8,8

Tris 0,75 molar, pH mit HCl, konz. auf 8,8 einstellen.

Tris-Puffer pH 6,8

Tris 0,75 molar, pH mit HCl, konz. auf 6,8 einstellen.

Lösungen und Puffer für die Doppelgradienten-Gelelektrophorese

Elektrodenpuffer

Zusammensetzung wie oben, pH mit HCl, konz. auf 8,5 einstellen.

Acrylamid-Stammlösung 5% (I)

Acrylamid	5,0	g
Bis	0,13	g
Tris	3,028	g
SDS	0,1	g

auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen und den pH mit HCl, konz. auf 7,0 einstellen.

Acrylamid-Stammlösung 10% (II)

Acrylamid	10,0	g
Bis	0,26	g
Tris	3,028	g
SDS	0,1	g

auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen und den pH mit HCl, konz. auf 7,0 einstellen.

Acrylamid-Stammlösung 25% (III)

Acrylamid	25,0	g
Bis	0,65	g
Tris	9,084	g
SDS	0,1	g
Glycerin	10,0	ml

auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen und den pH mit HCl, konz. auf 8,8 einstellen.

Ammoniumpersulfat-Stammlösung

Ammoniumpersulfat 10% (Gew.-%)

Probenpuffer für die Gelelektrophoresen

Saccharose	5,0	g
SDS	2,0	g
Tris	9,69	g

mit Aqua bidest. auf 95 ml auffüllen und den pH mit HCl, konz. auf 6,8 einstellen.

2-Mercapto-ethanol	5,0 ml
Bromphenolblau	0,1 mg

Färbebad für Polyacrylamid-Gele

Methanol	1000 ml
Eisessig	200 ml
Aqua bidest.	1000 ml
Serva Blau G	1,4 g

Entfärbebad für Polyacrylamid-Gele

Zusammensetzung wie oben, ohne Serva Blau G

3.1.4 Virusstämme

Das VHS-V (Stamm F_1) erhielten wir vom Fischgesundheitsdienst Niedersachsen.

Das SVC-V wurde uns freundlicherweise vom Fischgesundheitsdienst Bayern zur Verfügung gestellt.

Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

3.1.5 Zellkulturen

FHM-Zellen: Diese Zellen stammen aus dem caudalen Rumpf der Elritze (Pimephales promelas

oder Fathead Minnow) und sind epitheloid.

EPC-Zellen: Hierbei handelt es sich um Epithelioma papulosum carpio-Zellen.

Die FHM-Zellinie erhielten wir von der Fa. Flow, Bonn, die EPC-Zellinie vom Fischgesundheitsdienst Niedersachsen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellvermehrung

Als Kulturmedium für die verwendeten FHM- und EPC-Zellen diente Eagle's Medium (MEM = minimal essential medium) mit 10% (Vol-%) bei 56°C hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und folgenden Antibiotika-Zusätzen:

a) Bykomycin

Bykomycin ist ein Neomycinsulfat, welches hauptsächlich gegen grampositive und gramnegative bakterielle Keime eingesetzt wird. Die Dosis betrug 163 I.E./ml Kulturmedium.

b) Penicillin

Penicillin wurde mit 200 I.E./ml Kulturmedium appliziert.

c) Tylosintartrat

Tylosintartrat (Anti-PPLO-Agens ist ein Makrolidantibiotikum zur Unterdrückung von Mykoplasmen (PPLO). Es besitzt auch ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive Bakterien, jedoch

keine Wirkung gegen Enterobakterien. Angewendet wurde eine Endkonzentration von 50 µg/ml Kulturmedium.

Die Zellen wurde in Greiner-Gewebekultur-Plastikflaschen mit 75 cm^2 Bodenfläche zu einer Einzellschicht (Monolayer) herangezogen, mit VT (Versen-Trypsin) abgelöst und je nach Zelldichte 1:2 bis 1:3 vermehrt. Die Inkubationstemperatur betrug bei beiden Zellstämmen 20°C.

3.2.2 Virusvermehrung

Vorversuche hatten ergeben, daß sich die Zellen am besten eigneten, die am Vortag umgesetzt worden waren und eine Zelldichte von ca. 80% aufwiesen.

Die Virusvermehrung erfolgte in MEM, das 2% inaktiviertes fetales Kälberserum und Antibiotika-Zusätze, wie oben angegeben, enthielt.

Die Inkubationstemperaturen betrugen unabhängig von der verwendeten Zell-Linie bei VHS-V 15°C und bei SVC-V 20°C.

Das Virusinoculum enthielt 0,1-1 Plaque-bildende Einheiten (p.f.u. = plaque-forming units) pro Zelle in 1 ml Kulturmedium.

Die Zellen wurden eine Stunde bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert und dann mit 20 ml Nährmedium je Zellkultur-Flasche versetzt.

Ein zytopathischer Effekt (ZPE) trat bei den infizierten Zellen nach ca. 48 Stunden auf. Er war zunächst durch das Auftreten von abgekugelten Zellen

erkennbar, die sich in späteren Stadien vom Zellverband ablösten, wodurch Löcher im Zellrasen entstanden. In diesem Stadium konnte das im Kulturüberstand vorhandene Virus geerntet und nach der Virusreinigung I (siehe 3.2.3) als Impfvirus für weitere Versuche verwendet werden.

3.2.3 Virusreinigung I und Viruskonzentrierung I

Aus dem Gewebekultur-Überstand mit den darin befindlichen neu synthetisierten Viruspartikeln wurden durch Zentrifugation (STOCK, 3.000 UpM, 30 Min.) die zellulären Bestandteile abgetrennt. Der vorgereinigte und steril filtrierte Kulturüberstand diente als Impfmaterial für die Weitervermehrung und für die Markierungsversuche. Das ebenfalls Viruspartikel enthaltene Zellsediment wurde in 3.2.12 verwendet.

Für weitere Versuche wurde der vorgeklärte Überstand in Zentrifugenröhrchen mit 3 ml 20%iger Sucrose-Lösung (Gew.-% in TEN) unterschichtet. Nach Zentrifugation im Rotor SW 27 (bei 25.000 UpM, 120 Min., 4°C) konnte das Virus-Sediment in TEN- Puffer resuspendiert werden. Die Aufbewahrung des Viruskonzentrates erfolgte bei 4°C, beziehungsweise für längere Zeit bei -20°C.

3.2.4 Virusreinigung II und Viruskonzentrierung II

Eine zweite Virusreinigung konnte über die Gleichgewichts-Zentrifugation erzielt werden (siehe 3.2.5.1).

Die im Streulicht sichtbare Bande, welche die Viruspartikel enthält, wurde nach Durchstoßen des

Zentrifugenröhrchens von unten mit einer Kanüle entnommen.

Zur Konzentrierung wurde die Virussuspension 1:10 mit TEN verdünnt, wobei das TEN tropfenweise zugegeben werden mußte, um einen osmotischen Schock zu verhindern. Die so verdünnte Virussuspension wurde im Rotor SW 41 bei 35.000 UpM und 4°C in 70 Minuten auf den Boden des Zentrifugenröhrchens zentrifugiert. Das Virus-Pellet konnte dann je nach Weiterverwendung in der gewünschten Menge TEN oder Probenpuffer aufgenommen und weiterverarbeitet werden.

3.2.5 Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Dichtegradienten-Zentrifugation von Virussuspensionen dient zur Trennung und Reinigung aller Komponenten einer Mischung und ermöglicht dadurch unter anderem weitere analytische Untersuchungen. Sie erfordert eine unterstützende Flüssigkeitssäule, deren Dichte zum Boden des Zentrifugenröhrchens hin zunimmt.

Man unterscheidet prinzipiell zwei Methoden, die Zonen- und die Gleichgewichts-Zentrifugation (Griffith, 1976). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Gleichgewichtszentrifugation angewendet.

3.2.5.1 Gleichgewichts-Zentrifugation

Bei der Gleichgewichts-Zentrifugation werden vorgefertigte Gradienten verwendet. Die Partikel wandern infolge der Zentrifugalkraft entsprechend ihrer Sedimentationsrate, die von der Dichte, Form und Größe der Partikel abhängig ist, durch den Dichtegradient bis in die ihrer Dichte entsprechende Gradientendichte.

In dieser Arbeit wurden zunächst 10-60%ige (Gew.-% in TEN) Sucrosegradienten verwendet, die in 5%-Schritten geschichtet waren. Darüber wurde die Virussuspension geschichtet, und es erfolgte eine 24stündige Zentrifugation bei 4°C und 35.000 UpM im Rotor SW 41.

Zur Fraktionierung des Inhalts wurde der Boden des Zentrifugenröhrchens mit einer Kanüle angestochen und eine bestimmte Tropfenzahl pro Fraktion entnommen. Bei sichtbaren Banden wurde die gesamte Bande komplett abgenommen.

3.2.5.2 Gleichgewichts-Zentrifugation in Percoll

Im Laufe der Arbeit zeigte es sich, daß die Verwendung von Sucrosegradienten zur Schädigung der Viruspartikel, insbesondere bei SVC-V führte.

Es wurden daher auch Dichtezentrifugationen in Percoll durchgeführt. Percoll besteht aus kolloidalem mit PVP (Polyvinylpyrrolidon) beschichtetem Silikat und besitzt sowohl eine niedrige Osmolalität als auch eine niedrige Viskosität. Die niedrige Viskosität bewirkt eine schnelle Ausbildung des Gradienten. Percoll durchdringt keine biologischen Membranen und verändert daher nicht die Schwebedichte von Partikeln während der Zentrifugation.

Die Zentrifugationen wurden in einem dreistufigen Percollgradienten bei 4°C und 15.000 UpM im Rotor SW 50 durchgeführt. In Vorversuchen wurde als beste Zentrifugationszeit 60 Minuten ermittelt. Der Percollgradient wurde zu gleichen Anteilen aus folgenden Lösungen aufgebaut:

Lösung 1: 9 Teile Percoll + 1 Teil Earle 10-fach
Lösung 2: 1 Teil Lösung 1 + 1 Teil TEN
Lösung 3: 1 Teil Lösung 2 + 1 Teil TEN

Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, daß die Percoll-Partikel erheblich bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen stören und in der PAGE die Molekulargewichte der Proteine verfälschen können.

3.2.5.3 Gleichgewichts-Zentrifugation in Metrizamid

Metrizamid (2-[3-Acetamido-5-N-methylacetamido-2,-4,6-trijodbenzamido]-2-desoxy-D-glucose) ist ebenfalls inert, nichtionisch, bildet relativ niederviskose Lösungen und hat den Vorteil gegenüber Percoll, daß es bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht stört und in der PAGE die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine nicht beeinflußt.

Es wurden in 5%-Schritten geschichtete 10-50%ige (Gew.-% in TEN) Gradienten verwendet. Die Zentrifugation wurde im Rotor SW 41 bei 4°C und 35.000 UpM über 20h durchgeführt.

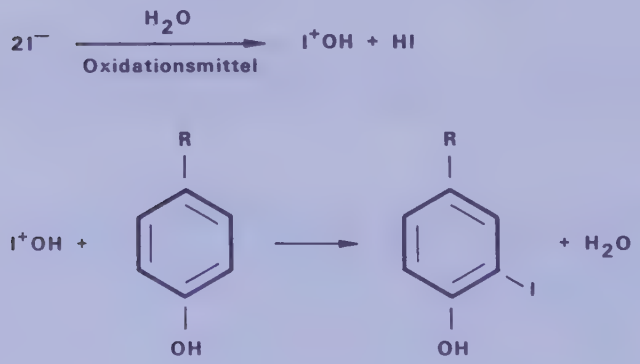
3.2.6 Radicaktive Markierungen

3.2.6.1 Prinzip der externen Markierung von Proteinen mit ^{125}I

Das Radionuklid ^{125}I zerfällt unter Elektroneneinfang mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen zu ^{125}Te. Dabei werden Gammastrahlen mit einer Energie von 0,035 MeV emittiert.

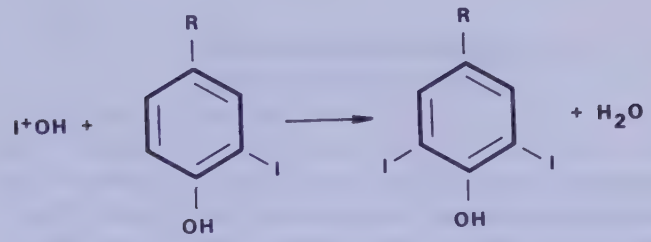
In fast allen iodmarkierten Verbindungen ist das Iod ein Fremdatom, das heißt Iod ist an der eingebauten Stelle kein Bestandteil des natürlichen Proteins. Es muß daher vorausgesetzt sein oder nachgewiesen werden, daß sich die unmarkierten Proteine ähnlich wie die markierten verhalten.

Das verwendete radioaktive Natriumiodid wird mittels eines Oxidationsmittels zu einem positiv geladenen Iodion oxidiert, welches an den Phenolrest der Aminosäure Tyrosin im Protein angelagert wird. Der tatsächliche Reaktionsablauf ist noch unklar (Hughes, 1966); es scheint jedoch folgendes Reaktions-Schema vorzuliegen:



Die Hydroxylgruppe im Phenolrest bedingt als Substituent erster Ordnung die ortho-Stellung des Iod.

Läßt man die Reaktion zu lange ablaufen, entsteht folgendes Produkt:



Unter bestimmten Bedingungen finden auch unerwünschte Histidyl- und Cysteingruppen-Markierungen eines Proteins statt, welche die exakte Reproduzierbarkeit der Markierung stören.

3.2.6.1.1 Markierung mit der ^{125}I-Chloramin-T-Methode

Als Methode zur Markierung von Proteinen wurde das von Greenwood und Hunter, 1963 erarbeitete und von Enzmann, 1980, modifizierte Verfahren angewendet.

Zu 0,5 ml der Proteinmischung (in TEN) wurden 10 µl einer trägerfreien Lösung mit 500 µCi ^{125}I gegeben. Der Start der Einbau-Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 µl einer Stammlösung mit 3 mg Chloramin-T/ml.

Nach drei Minuten Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch auf eine standardisierte, mit TEN equilibrierte Sephadex-C25- Fertigsäule gegeben. Die Säulenchromatographie diente zur Trennung des mit ^{125}I markierten Proteingemisches, das im Ausschuß wandert, von nicht eingebautem radioaktiven Iod sowie vom Oxidationsmittel Chloramin-T. Es wurde mit 10 Tropfen pro Fraktion

fraktioniert und die iodmarkierten Protein-Fraktionen durch Messung der Radioaktivität ermittelt.

3.2.6.2 Metabolische Markierung mit L-[^{75}Se]-Selenmethionin

3.2.6.2.1 Prinzip der metabolischen Markierung

Die Markierung mit L-[^{75}Se]-Selenmethionin anstelle von L- [^{35}S]-Methionin wurde angewendet, weil es sich bei dem Radionuklid ^{75}Se um einen Gammastrahler (Energie 60-540KeV) mit einer Halbwertszeit von 120 Tagen handelt, der unter Elektroneneinfang zu ^{75}As zerfällt.

Der "Ersatz" des Schwefels durch das wesentlich größere Selen, das im Periodensystem der Elemente in der gleichen Gruppe wie Schwefel steht, also die gleiche Wertigkeit und ähnliche chemische Eigenschaften hat, jedoch eine Periode tiefer steht, bietet den Vorteil, daß die Messung der Radioaktivität problemlos im Gammazähler erfolgen kann. Die für die Betamessung üblichen Arbeitsabläufe wie Pipettieren von aliquoten Anteilen bei flüssigen Proben, die umständliche Vorbehandlung von Proben in Gelscheibchen zur Ermöglichung eines direkten Kontaktes zwischen radioaktiv markierten Partikeln und Szintillator, das Zumischen von Szintillations-Flüssigkeit, was mit einem Verlust des zu messenden Materials verbunden ist, entfallen damit.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die mit dem ^{75}Se etwas exotisch veränderte Aminosäure Methionin von den Zellen beziehungsweise Ribosomen als normale Aminosäure erkannt und in den entsprechenden Polypeptid-Strang eingebaut wird. Bei den mit ^{75}Se oder den mit dem "natürlichen" ^{35}S markierten Proteinen ergaben sich hinsichtlich der Molekulargewichte in der

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese keine Unterschiede (Deuter, 1981, Enzmann, 1982).

3.2.6.2.2 Durchführung der metabolischen Markierung

Zur radioaktiven Markierung von VHS-V und SVC-V wurden Zellen wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben infiziert, wobei jedoch die Konzentration des Virusinoculums so gewählt wurde, daß ein vollständiger ZPE 48 Stunden nach der Infektion auftrat.

24 Stunden nach der Infektion wurde der Kulturüberstand abgegossen, die Kulturflaschen mit je 10 ml VM3A-MEM im Verhältnis 9:1 (2% fetales Kälberserum, Antibiotikazusätze wie oben) versetzt (Enzmann und Weiland, 1978) und mit 15 µCi L-[^{75}Se]-Selenmethionin/ml markiert.

Die obige Medienmischung wurde angewendet, um den Anteil des markierten gegenüber dem unmarkierten Methionin zu erhöhen und somit eine höhere Einbaurate des radioaktiven Materials zu erreichen.

Um möglichst wenig zelluläre Proteine zu markieren, enthielt das Kulturmedium noch 1 µg Actinomycin D/ml (diese Konzentration hatte sich in Vorversuchen als am günstigsten herausgestellt). Die Wirkung des Actinomycin D besteht darin, daß es mit dem DNS-Doppelstrang Komplexe bildet, indem es sich an Guanin anlagert; es inhibiert die Synthese aller DNS-codierten RNS-Typen (Schlegel, 1974).

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 15°C (VHS-V) beziehungsweise 20°C (SVC-V) wurde der Zellkulturüberstand mit den inzwischen abgelösten Zellen abgegossen und wie in den Kapiteln 3.2.3, 3.2.4 beschrieben, weiter aufgearbeitet.

3.2.7 Messung der Gammastrahlung

Bei der Messung von Gammastrahlen verwendet man einen Natriumiodid- Einkristall als Fest-Szintillator. Die eintreffenden Cammaquanten treten in Wechselwirkung mit den Elektronen des Szintillators. Dabei gibt der Gammaquant seine Energie entweder auf einmal (Photoeffekt) oder in mehreren Teilschritten an das Szintillator-Material ab (Compton-Effekt). Der Szintillator gibt von der aufgenommenen Energie einen Teil als Photonen wieder ab, die von einer Photo-Kathode erfaßt werden. Es erfolgt also eine Messung ohne Zusatz von Szintillatoren, die Probe kann nach der Messung für weitere Versuche verwendet werden.

3.2.8 Autoradiographie

Die Autoradiographie wird zum Nachweis von Radioaktivität verwendet. Die Vorteile der radioaktiven Strahlung sind einerseits eine sehr genaue Lokalisierung der betreffenden Radionuklide und andererseits die wesentlich höhere Nachweisgrenze radioaktiv markierter Proteine gegenüber Proteinen, die mit den üblichen Färbemethoden nachgewiesen werden.

Die Anfertigung einer Autoradiographie erfordert eine glatte Oberfläche des Präparates und einen möglichst engen Kontakt zwischen Präparat und Röntgenfilm.

Die mit einer Autoradiographie erreichbare Auflösung hängt von der Dicke des Präparates ab, in dem sich das Radionuklid befindet und vom Abstand zwischen Präparat und Röntgenfilm (Lieser, 1969; Bachmann, 1970).

Bei den durchgeführten Autoradiographien wurde die Kontaktmethode angewendet, das heißt, das getrocknete

Flachgel wurde mittels zweier Platten in engen Kontakt mit dem Röntgenfilm gebracht und je nach Stärke der Radioaktivität verschieden lange in einer lichtundurchlässigen Kammer exponiert.

Anschließend erfolgte die Entwicklung des Films im D-19- Entwickler von Kodak für 5 Minuten und die Fixierung im Tetanal-Schnellfixierbad (1 Teil Tetanal und 7 Teile Wasser) für ebenfalls 5 Minuten. Nach zehnminütiger Wässerung in fließendem Wasser wurden die Filme getrocknet.

Die auf dem Film durch radioaktive Strahlung sichtbar gewordenen Banden wurden ausgemessen und die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteinbanden wie in Kapitel 3.2.9.2.1 beschrieben bestimmt.

3.2.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

3.2.9.1 Prinzip der PAGE

Zur erfolgreichen Durchführung einer elektrophoretischen Proteintrennung muß die Probensubstanz in ein Medium gebracht werden, das chemisch weitgehend inert, nichtionisch, vollkommen durchsichtig und von fester Konsistenz ist und nicht mit Färbereagenzien reagieren darf.

Diese Bedingungen werden am besten von feinvernetzten Trägergelen wie den Polyacrylamid-Gelen erfüllt.

Dieses Polymer ist ein Kopolymerisat von Acrylamid und dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), welches mittels einem Katalysator-Redoxsystem aus Ammoniumpersulfat und N,N,N'N'- Tetramethylendiamin (TEMED), das freie Radikale liefert, gebildet wird.

Für die Trennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen können außer den Unterschieden in der elektrischen Ladung der einzelnen Teilchen auch deren Unterschiede in der Molekülgröße ausgenutzt werden. Bei der elektrophoretischen Wanderung durch die Poren der dreidimensionalen Gelstrukturen werden größere Proteine durch den Molekularsiebeffekt gegenüber kleineren, gleichgeladenen Proteinen gebremst. Dadurch wird eine Auftrennung verschieden großer, aber gleichgeladener Proteine in einem Substanzgemisch erreicht. Um gleichgeladene Moleküle zu erhalten, werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. Dabei lagern sich die SDS-Moleküle an verschiedene Bereiche des Proteinmoleküls an. Sämtliche für das Protein spezifische Ladungen sind danach abgesättigt, und das Makromolekül wird weitgehend aufgeknäuelt.

1962 wurde von Ornstein und Davis die Methode der Disk-Elektrophorese oder Elektrophorese mit diskontinuierlichem pH-Wert eingeführt. Der wichtigste Unterschied zur kontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese ist die Verwendung von unterschiedlichen Puffersystemen in der Gelmatrix und in der Elektrolytflüssigkeit. Diese Anordnung bewirkt einen Spannungsgradienten, der während des Trennungsvorganges durch das Gel wandert. Das auf das Gel aufgetragene Material wird an der Grenzfläche Puffer-Gel zu einer schmalen Zone konzentriert (Maurer, 1971).

Eine weitere Methode zur Auftrennung von Teilchen unterschiedlicher Größe wurde von Hedrick und Smith 1968 entwickelt. Sie bestimmten die Beweglichkeit eines Proteins in Gelen mit unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration und somit unterschiedlichen Porengrößen.

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins ist abhängig von den Parametern pH, Konzentration des Acrylamids und

der Ionenstärke im Gel. Die Gelkonzentration ist von großer Bedeutung für die Disk-Elektrophorese, die den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamids ausnutzt. Durch die Wahl der Gelkonzentration kann die mittlere Porengröße direkt auf die zu trennenden Moleküle abgestimmt werden.

3.2.9.2 Röhrchengel-Elektrophorese

Die Verwendung von Röhrchengelen bietet zwei Vorteile: die in Scheibchen geschnittenen Gele lassen sich bei Markierungen direkt messen, sodaß eine Autoradiographie entfällt, und nach der Messung lassen sich die Gelscheibchen für weitere Untersuchungen verwenden.

Sämtliche Röhrchengel-Elektrophoresen wurden mit 10%igen (Gew.- %) Polyacrylamid-Trenngelen und 5%igen (Gew.-%) Konzentriergelen durchgeführt.

Trenn- und Konzentriergel hatten folgende Zusammensetzung:

Trenngel:	9,92	ml Acrylamid-Stammlösung
	10,84	ml 0,75 M Tris, pH 8,8
	9,09	ml Aqua bidest.
	0,15	ml 20%ige (Gew.-%) SDS-Lösung
	119	µl 10%iges (Gew.-%) Ammoniumpersulfat
	24	µl TEMED
Konzentriergel:	1,17	ml Acrylamid-Stammlösung
	0,88	ml 0,75 M Tris, pH 6,8
	0,035	ml 20%ige (Gew.-%) SDS-Lösung
	35	µl 10%iges (Gew.-%) Ammoniumpersulfat
	7,02	µl TEMED

Als Träger für das Gel dienten silikonisierte Präzisions-Borsilikatröhrchen der Firma BioRad mit 125mm Länge und einem Innendurchmesser von 4,84mm ± 0,02 mm.

Zum Füllen der Röhrchen mit den fertigen Gellösungen wurden diese am unteren Ende mit Gummikappen verschlossen. Die Füllhöhe betrug bei allen Versuchen 9 cm.

Nach dem Eingießen des Trenngeles wurde die Flüssigkeitssäule vorsichtig mit 0,2 ml Aqua bidest. überschichtet, um das Entstehen eines Meniskus auf der Oberfläche des fertigen Gels zu vermeiden. Da die Oberfläche des Gels die Startzone für die Trennung bildete, mußte sie eben sein, um ein gleichzeitiges Eindringen aller zu trennenden Proteine zu gewährleisten.

Nach einer Polymerisationszeit von ca. 45 Minuten wurde das Aqua bidest. entfernt. Anschließend erfolgte das Gießen des Konzentriergeles mit einer Füllhöhe von 0,5 cm und das Überschichten mit 0,2 ml Aqua bidest. Um eine homogene Polymerisation zu erreichen, wurden die Röhrchengele bis zum Gebrauch ca. 20 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Das zu trennende radioaktiv markierte Proteingemisch wurde mit der gleichen Menge Probenpuffer versetzt (Endkonzentration an SDS 1% (Gew-.%) und zwei Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt.

In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration konnten dann bis zu 100 µl des vorbereiteten Probenmaterials pro Röhrchen aufgetragen werden. Während der Eindring- und Konzentrierungsphase wurden 2,5 mA pro Röhrchen angelegt. Sobald die Probensubstanzen das Trenngel

erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 5 mA pro Röhrchen erhöht.

Nach der Trennung (Laufzeit ca 1 1/2 Stunden) wurden die Gele aus dem Röhrchen entfernt, indem man mit einer Spritze und einer hypodermischen Nadel Aqua bidest. zwischen die Glaswand und das Gel injizierte. Die Spritze wurde dabei mit einer rotierenden Bewegung um das Gel herumgeführt und das Aqua bidest. langsam herausgedrückt, bis sich das Gel von der Glaswand löste und herausrutschte.

Mit Hilfe eines Schneidegerätes (hergestellt in der feinmechanischen Werkstatt des Instituts) und einer Rasierklinge wurden die Gele dann in 1,5 mm dicke Scheibchen geschnitten.

Die Messung der Radioaktivität der einzelnen Scheibchen erfolgte nach dem in Kapitel 3.2.8 beschriebenen Verfahren.

Als Referenzsubstanz diente eine mit ^{125}Iod markierte Proteinmischung (siehe 3.2.6.1.1) der Firma Pharmacia.

3.2.9.2.1 Auswertung der Röhrchengel-Elektrophorese

Die Trennung von Proteinen mit einheitlicher Ladung (infolge der SDS-Behandlung) erfolgt nur aufgrund der Molekülgröße. Zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der Wanderungsstrecke des Proteins in der SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese kann eine lineare Beziehung aufgestellt werden, und zwar ist der Logarithmus des Molekulargewichts umgekehrt proportional zur Wanderungsstrecke des Proteins (Shapiro, 1967).

Mit Hilfe dieser Beziehung erhält man eine Eichgerade, wenn man die Wanderungsstrecken der Referenzsubstanzen gegen den Logarithmus ihrer bekannten Molekulargewichte aufträgt. Aufgrund der Wanderungsstrecken der unbekannten Proteine lassen sich so deren Molekulargewichte aus der Eichkurve ablesen.

3.2.9.3 Diskontinuierliche Flachgel-Elektrophorese

Die Vorbereitung und Zusammensetzung der Gellösungen entsprach derjenigen der Röhrchengele.

Die fertige Trenngel-Mischung wurde in die vorbereitete Gelkammer eingefüllt (Plattengröße: 15,5 x 14 cm). Direkt auf das noch nicht polymerisierte Trenngel wurde mittels einer Schlauchpumpe vorsichtig das Konzentriergel aufgegossen, um einen "engen" Kontakt zwischen Trenn- und Konzentriergel zu erreichen. Dieses Verfahren verhindert ein Ineinanderlaufen der Proteinspuren während des Übertritts vom Trenn- in das Konzentriergel. Nach einer Polymerisationszeit von ca. einer Stunde wurde das Gel mit Aqua bidest. überschichtet und bis zur vollständigen Polymerisation 20 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Nach der Entnahme des Kammes wurden die Kammern mit Elektrodenpuffer gespült und eventuell vorhandene Gelreste mit einer Spritze entfernt.

In Abhängigkeit von der Kammgröße konnten dann 20-70 µl an Probenmaterial, das zuvor zwei Minuten im Probenpuffer bei 100°C denaturiert worden war, eingefüllt werden.

Während der Eindring- und Konzentrierungsphase wurden 35 mA pro Gel angelegt; sobald die Probensubstanzen das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 70 mA pro Kammer erhöht. Nach beendeter Laufzeit (ca. zwei Stunden) erfolgte eine mindestens dreistündige Färbung des Gels im Färbebad und die anschließende Entfärbung im Entfärbebad über Nacht. Nach dem Trocknen konnten dann die sichtbaren Banden vermessen, und mit Hilfe der mitgelaufenen Markerproteine konnte eine Eichkurve aufgestellt werden, aus der die Molekulargewichte der viralen Proteinbanden zu bestimmen waren.

Die radioaktiv markierten Banden wurden mittels Autoradiographie (siehe 3.2.8) ermittelt, die weitere Auswertung erfolgte dann wie oben.

3.2.9.4 Doppelgradienten-Gelelektrophorese

Um Proteingemische mit "weitem" Molekulargewichts-Bereich aufzutrennen, empfiehlt sich die Anwendung eines SDS-Polyacrylamid-Gradientengels (Lambin et al., 1976).

Die zunächst verwendeten 10-25%-igen (Gew.-%) Polyacrylamidgele mit einem 5%-igen (Gew.-%) Konzentriergel erwiesen sich jedoch als nicht effizient genug, auch Proteine mit Molekulargewichten kleinergleich 14.000 d befriedigend aufzutrennen.

Es wurde daher ein Doppelgradienten-Gelelektrophorese-System entwickelt, zu dessen Verständnis folgende Erläuterungen dienen sollen.

3.2.9.4.1 Theorie der diskontinuierlichen Gelelektrophorese

Zu Beginn einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970), gelten folgende pH-Bedingungen:

Elektrodenpuffer: pH 8,3 (Tris-Glycin)
Konzentriergel-Puffer: pH 7,0 (Tris-HCl)
Trenngel-Puffer: pH 8,8 (Tris-HCl)

Beim Start der Elektrophorese spielen sich folgende Vorgänge ab:

Im Elektrodenpuffer-System Tris-Glycin nimmt die Nettoladung $Tris^+$ zu und die Nettoladung $Glycin^-$ ab. An der obersten Front im Konzentriergel gilt dann, daß das Gelpuffer-System Tris-HCl alkalisch wird infolge des Eindringens des alkalischen Elektrodenpuffers, wodurch die Nettoladung von $Tris^+$ abnimmt und dadurch bedingt die Dissoziation von Cl^- ebenfalls. Dies hat zur Folge, daß das Cl^- mit der Nettoladung -1 im Gel wandert, das Glycin mit der Nettoladung kleiner -1 nachgezogen wird und $Tris^+$ das Gegenion ist. Das Protein sammelt sich zwischen dem Cl^- und dem $Glycin^-$ an, weil dessen Nettoladung zwischen der von Cl^- und $Glycin^-$ liegt (Cooper, 1981; Brewer, 1977).

Im Konzentriergel bildet nun Cl^- die Startfront und wandert voraus, das Protein dringt ein und das $Glycin^-$ folgt nach. Durch das Eindringen der Glycinionen in das Konzentriergel wird die angelegte Spannung auf beide Ionenarten verteilt. Die Cl^-- Ionen wandern infolge des Abfalles von ΔU langsamer.

Durch die verringerte Nettoladung der Glycinionen infolge des sauren pH's und somit des Anstiegs von ΔU wandern diese schneller.

Die Folge ist ein Schub der Glycinionen auf das Proteingemisch, welches aber in Richtung Trenngel gebremst wird durch die verlangsamten Cl^--Ionen; die Proteine werden in engen Banden gestapelt.

Beim Erreichen des Trenngels gilt dann für die Pufferfront, daß das Puffersystem Tris-Glycin alkalischer wird, somit die Nettoladung $Tris^+$ abnimmt und die Nettoladung Cl^- ebenfalls.

An der obersten Front im Trenngel gelten die entgegengesetzten Verhältnisse: das Puffersystem Tris-HCl wird sauer und daher nimmt die Nettoladung $Tris^+$ zu und die Nettoladung Cl^- ebenso.

Sobald die Pufferfront durchlaufen ist, wird dieser Effekt aufgehoben, da hinter der Pufferfront die alkalischen Gelbedingungen vorherrschen.

Bedingt durch den pH-Sprung und der damit verbundenen geringeren Dissoziation des Tris-HCl verringert sich also die Cl^--Konzentration, ΔU wird größer und das Chloridion läuft schneller.

Die $Glycin^-$-Konzentration erhöht sich, bedingt durch den höheren pH ebenfalls, wodurch die Nettoladung der Glycinwolke steigt und somit ein schnellerer Lauf der Glycinwolke erfolgt und diese die Proteine überholt.

Aus der Summe dieser Vorgänge sowie der Tatsache, daß die Proteine nun im Trenngel mit der geringeren Porengröße infolge der höheren Reibung gebremst werden, erfolgt eine Aufspreizung der engen Bandenbildung, die im Konzentriergel vollzogen wurde.

3.2.9.4.2 Herstellung der Doppelgradienten-Gele

Zur Analyse der Peptide aus der limitierten Proteolyse (3.2.10.3) wurden Doppelgradienten-Elektrophoresen in Flachgelen der Größe 15,5 x 18 cm durchgeführt.

Zur Anfertigung der Gele wurden vermischt (siehe 3.1.3):

a) 10,0 ml Stammlösung I mit 10 µl TEMED und 20 µl 10%igem (Gew.-%) Ammoniumpersulfat
b) 19,5 ml Stammlösung II mit 10 µl TEMED und 20 µl 10%igem (Gew.-%) Ammoniumpersulfat.
c) 19,5 ml Stammlösung III mit 10 µl TEMED und 15 µl 10%igem (Gew.-%) Ammoniumpersulfat.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer Schlauchpumpe wurde das Doppelgradienten-Gel aus den Stammlösungen II und III von unten aufgebaut und anschließend direkt das Konzentriergel (Stammlösung I) von oben aufgegossen.

Die Durchführung der Elektrophorese einschließlich der limitierten Proteolyse erfolgte dann wie in 3.2.10 beschrieben.

3.2.10 Untersuchungen an Virusproteinen

3.2.10.1 Die limitierte Proteolyse und die Analyse der resultierenden Peptidmuster in der Doppelgradienten-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen ist ein wirksames Werkzeug für die Trennung von Polypeptid-Ketten aus komplexen biologischen Proben. Oft ist aber eine eindeutige Identifizierung beziehungsweise

Charakterisierung der Proteine aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit allein nicht möglich.

Cleveland et al. entwickelten 1977 eine relativ schnelle und bequeme Methode zur Proteinkartierung in Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe der limitierten Proteolyse in Gegenwart von SDS und der anschließenden Auftrennung der Spaltprodukte in einer weiteren diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Mit Hilfe von Proteasen, die Proteine an genau definierten Stellen schneiden, wird das zu untersuchende Protein in charakteristische Peptidstücke aufgespalten. Wählt man die Bedingungen entsprechend, so erhält man Peptide einer Größenordnung, die sich in der Gelelektrophorese noch auftrennen lassen und somit ein für jedes Protein spezifisches Peptidmuster bilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Cleveland entwickelte, aber hier modifizierte Methode angewendet, um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Strukturproteinen von VHS-V und SVC-V zu untersuchen.

3.2.10.2 Verwendete Proteasen

a) TPCK-Trypsin

Bei TPCK-Trypsin handelt es sich um eine Rinder-Pankreasprotease, die zur Entfernung von Chymotrypsinaktivität mit Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethyl-keton (TPCK) behandelt wurde.

Sie spaltet spezifisch Ester-, Amid- und Peptidbindungen an der Carboxylseite von L-Arginin und L-Lysin.

Es wurden 1,4 U (units) pro Gelscheibchen eingesetzt (siehe 3.2.9.2). Eine U katalysiert den Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute bei 25°C und optimalen pH-Wert (Kezdy, 1965).

b) Staphylococcus aureus V8 Protease

Diese Protease wird aus Staphylococcus aureus, Stamm V8, isoliert (Drapeau, 1972).

Sie schneidet spezifisch an der Carboxylseite von L-Asparagin- und L-Glutaminsäure und wurde ebenfalls mit 1,4 U pro Gelscheibchen angewendet.

3.2.10.3 Durchführung der limitierten Proteolyse

Die limitierte Proteolyse erfolgte in den in 3.2.9.4.2 beschriebenen Doppelgradienten.

Hierzu wurden die nach 3.2.9.2 erhaltenen radioaktiv markierten, proteinhaltigen Gelscheibchen in je eine Geltasche gebracht und mit 1,4 U der jeweiligen Protease 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Gelkammer vorsichtig mit Elektrodenpuffer aufgefüllt und die Proteinscheibchen mit je 40 µl Probenpuffer versetzt werden. Als Referenzsubstanz diente die mit ^{125}I markierte Proteinmischung von Pharmacia.

Die Elektrophorese wurde nach den in 3.2.9.3 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die Laufzeit betrug ungefähr 3 1/2 Stunden. Die nach dem schon erwähnten Verfahren erhaltenen Gele wurden mit dem Laser-Densitometer 2202 Ultroscan von LKB

ausgemessen und anschließend in einem Apple IIe Computer ausgewertet.

3.2.11 Herstellung von Immunseren

3.2.11.1 Serumgewinnung

3.2.11.1.1 Gewinnung von Anti-VHS-V und Anti-SVC-V-Immunseren in Kaninchen

Zur Gewinnung von Immunseren gegen VHS-V und SVC-V wurden Kaninchen dreimal im Abstand von vier Wochen eine über ein Zuckerpolster gereinigte Virussuspension (3.2.3) mit DEAE-Dextran als Adjuvans (Wittmann und Jakubik, 1979) i.m. verabreicht. Anschließend erfolgten im Abstand von drei bis vier Wochen drei "Booster"-Injektionen i.d. ohne Adjuvans. Das Blut wurde 6-7 Tage nach der letzten Injektion über die Ohr-Randvene entnommen.

3.2.11.1.2 Gewinnung von Anti-VHS-V-Immunserum in der Ziege

Die Immunisierung erfolgte wie oben beschrieben. Das Blut wurde eine Woche nach der letzten Injektion über die Halsvene entnommen.

3.2.11.1.3 Gewinnung von Immunseren gegen spezifische Virusproteine

Die in der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (3.2.9.3) isolierten Proteinbanden wurden zunächst in PBS gewaschen und dann in einem Homogenisator der Fa. Braun, Melsungen, homogenisiert.

Das so erhaltene Protein-Gel-Homogenisat wurde Kaninchen ebenfalls i.m. appliziert.

Die Blutgewinnung erfolgte eine Woche nach der letzten Injektion.

3.2.11.2 Serumreinigung

Das wie oben gewonnene frische Kaninchen- beziehungsweise Ziegenblut wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, damit sich der Blutkuchen absetzen und zusammenziehen konnte. Danach erfolgte eine 30minütige Zentrifugation bei 3000 UpM in der Stock-Zentrifuge. Der Überstand (Serum) wurde vorsichtig abgenommen und mit Freon (Trifluortrichlorethan) im Verhältnis 1:3 versetzt, um das Serum von noch vorhandenen Lipiden zu befreien. Nach 10minütigem Schütteln und erneuter Zentrifugation (3000 UpM, Stock-Zentrifuge) konnte das gereinigte Serum (Überstand) abgezogen und wie in 3.2.12 beschrieben verwendet werden.

3.2.12 Radioimmunpräzipitation (RIP)

Die unten beschriebene Methode beruht auf der Fähigkeit des Protein A (PA) IgG-Moleküle, und in geringerem Maße zumindest teilweise auch IgM- und IgA-Moleküle, zu binden. Das Protein besitzt eine starke, hochspezifische Affinität zur IgG-Fc Region und wird aus Staphylococcus aureus gewonnen. PA ist an Sepharose CL-4B gebunden, was unter anderem eine quantitative Fällung des in der Radioimmun-Präzipitation erhaltenen Antigen-Antikörper-Komplexes ermöglicht (Langone, 1982).

3.2.12.1 Vorbereitung der RIP

0,5 ml des nach 3.2.11.2 gereinigten Serums wurden mit 0,5 ml gequollener PA-Sepharose (0,5 g PA-Sepharose in

2 ml PBS) versetzt und unter Rühren 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde der IgG-PA-Sepharose-Komplex in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und zweimal mit je einem ml PBS gewaschen und wie oben zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationen erfolgten ebenfalls in dieser Zentrifuge. Das letzte Sediment wurde in 0,5 ml PBS aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

Als Antigen dienten zellgebundene, radioaktiv markierte Virusproteine (siehe 3.2.3). Hierzu wurde das Zellsediment mit 2% Triton (Endkonzentration) und 0,1% SDS eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation konnte der Antigen-haltige Überstand gewonnen werden.

3.2.12.2 Durchführung der RIP

Zu 100 µl Antigen-Suspension wurden 150 µl der an PA-Sepharose gebundenen Antikörper gegeben und eine Stunde unter Rühren bei 20°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 0,8 ml PBS und nachfolgender Zentrifugation wurde das Sediment in 100 µl Probenpuffer aufgenommen und zur Analyse des Immunkomplexes einer diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wie in 3.2.9.2 beschrieben, unterworfen.

3.2.13 Gegenstrom-Immunelektrophorese

Der Nachweis präzipitierender Antikörper kann mit der Gegenstrom-Immunelektrophorese erfolgen. Unter geeigneten Pufferbedingungen (Barbitalpuffer, pH 8,2) wandern die Antigene im elektrischen Feld zur Anode, während die Antikörper unter diesen Bedingungen nicht wandern. Bedingt durch die Elektroendosmose werden sie jedoch im endosmotischen Flüssigkeitsstrom zur Kathode mitgerissen (Gocke und Howe, 1970).

Als Antigen wurde mit L-[^{75}Se]-Selenmethionin radioaktiv markiertes VHS-V beziehungsweise SVC-V verwendet.

Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte auf Glasplatten (10 x 10 cm), die auf dem Nivelliertisch mit 20 ml einer 1%igen (Gew.-%) Agarose-Lösung (hohe Elektroendosmose)in Barbitalpuffer, pH 8,2, beschichtet worden waren. Nach dem Erstarren wurden entweder gegenüberliegend oder versetzt 4 mm große Löcher als Antigen- beziehungsweise Antikörper-Depots gestanzt.

In einem elektrischen Feld von 5 Volt/cm dauerte die Elektrophorese 30 Minuten.

Der Nachweis der Präzipitationslinien erfolgte durch die Autoradiographie. Hierzu mußte das Gel zunächst mehrmals mit einmolarer NaCl-Lösung und anschließend mit Aqua dest. gewässert werden, um den unspezifischen radioaktiven Hintergrund zu entfernen.

3.2.14 Elektro-Immundiffusion (nach Laurell)

Ein radioaktiv markiertes Antigen hinterläßt bei der Wanderung im elektrischen Feld ein langgestrecktes Immunpräzipitat ("rocket"), welches durch die Autoradiographie nachgewiesen werden kann, wenn im Gel ein homologes Antiserum in gleichmäßiger Verteilung vorhanden ist. Die Länge des Präzipitats ist proportional zur Konzentration des Antigens, wenn dieses in einem definierten Volumen aufgetragen wird (Laurell, 1966).

Mit der Elektro-Immundiffusion sind alle Proteine bestimmbar, deren elektrophoretische Beweglichkeit sich von der Beweglichkeit der im Agarosegel enthaltenen Antikörper unterscheidet.

Die Durchführung der Elektro-Immundiffusion erfolgte auf Objektträgern. Mit Barbitalpuffer, pH 8,6, wurde eine 1,5%ige (Gew.-%) Agaroselösung (niedrige Elektroendosmose) angesetzt und auf 56°C erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde das Antiserum (2,5 ml Agarose-Lösung und 0,5 ml Serum) zugemischt. Nach dem Erstarren wurden an einem Ende des Objektträgers 4mm große Löcher für die Aufnahme des Antigens gestanzt. Die Laufzeit betrug bei einer Feldstärke von 7-10 Volt/cm zirka 90 Minuten; als Elektrodenpuffer wurde Barbital-Puffer, pH 8,6, verwendet.

Wendet man die oben beschriebene Technik zweidimensional an (Tandem-Technik), indem man zunächst die verschiedenen Antigene im Abstand von 5-6 mm hintereinander in ein reines Agarosegel und dann um 90° gedreht in ein Antikörper-haltiges Gel einwandern läßt, so hinterlassen sie bei ihrer Wanderung durch das Antikörper-haltige Gel in der zweiten Dimension eine ineinanderfließende Linie, falls eine antigene Verwandtschaft vorliegt. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Präzipitate erfolgte wie oben.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Dichtebestimmungen des VHS-V und SVC-V in verschiedenen Dichtegradienten

Die angewendeten Gradienten sowie die Auswertung der Dichteläufe werden im folgenden beschrieben. In der Gleichgewichtszentrifugation wird die Schwebedichte ermittelt, die als Maß für die "Virus-Dichte" verwendet wird.

Die ermittelten Dichtewerte für das VHS-V und SVC-V sind in 4.1.2 zusammengefaßt.

4.1.1 Verwendete Gradienten und Auswertung der Dichteläufe

a) Sucrosegradient

Das nach 3.2.6.2.2 markierte Virus wurde über ein 20%iges (Gew.-%) Sucrosepolster gereinigt und in 1,0 ml TEN-Puffer aufgenommen. Aliquote, die 20.000 - 30.000 IpM enthielten, wurden auf 0,9 ml mit TEN-Puffer verdünnt und auf einen 10-60%igen (Gew.-%) Sucrosegradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte im Rotor SW 41 bei 4°C und 35.000 UpM für 24 Stunden.

Die Dichtewerte konnten im Refraktometer nach Abnahme der Fraktionen von unten (15 Tr./Frkt.) und anschließender Messung der Radioaktivität ermittelt werden.

b) Percollgradient

Die Virussuspension wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet und auf einen dreistufigen Percollgradienten (siehe 3.2.5.2) geschichtet. Die Zentrifugation

Stunde. Von den abgenommenen Fraktionen wurden der Refraktionsindex und die Radioaktivität gemessen.

Die gewählten Bedingungen liefern im Virusdichte-Bereich die beste Linearität. Verringert man die Zentrifugationszeit, so ergeben sich größere Abstufungen im Percollgradienten, bei längerer Zentrifugationszeit verflacht der Gradient im gewünschten Bereich zunehmend (Daten hier nicht gezeigt).

Die Bestimmung der Dichte erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia). Der Eichkurve in Abbildung 3 liegt eine Verdünnung der Percoll-Stammlösung in 0,15 M NaCl zugrunde, die der in dieser Arbeit angewendeten NaCl-Konzentration entspricht.

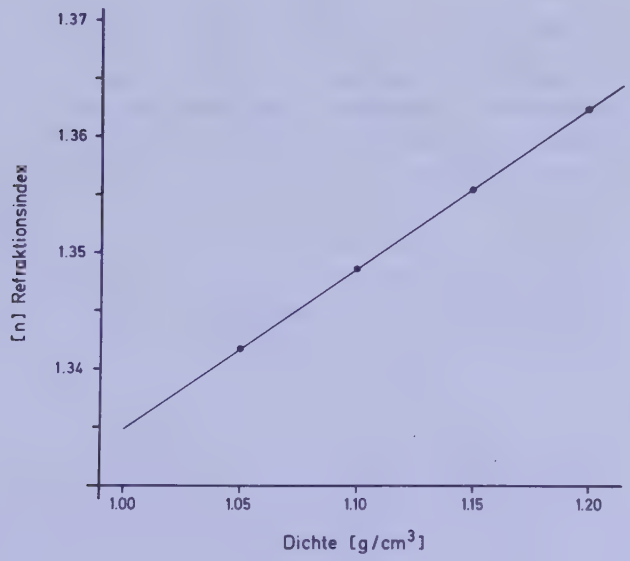


Abb. 3: Eichkurve zur Dichtebestimmung von Percollgradienten

c) Metrizamidgradient

Auf den in 5%-Schritten geschichteten 10-50%igen (Gew.-% in TEN) Gradienten wurde wie oben 0,9 ml der Virussuspension aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte im Rotor SW 41 bei 35.000 UpM und 4°C für 20 Stunden. Nach der Fraktionierung des Gradienten wurde der Brechungsindex und die Radioaktivität jeder Fraktion wie oben ermittelt.

Zur Virusdichte-Bestimmung mußte zunächst aus dem jeweiligen Brechungsindex die Dichte nach Birnie (1973) ermittelt werden:

$$d = 3{,}350 \cdot n - 3{,}462$$

d = Dichte
n = Brechungsindex

In Tabelle 2 sind die entsprechenden Dichte- und Brechungsindex-Werte aufgeführt, aus denen die zur Ermittlung der Virusdichte erforderliche Eichkurve (Abb. 4) aufgestellt wurde.

Metrizamid [Gew.-% in TEN]	Refraktionsindex [n]	Dichte [g / cm^3]
5	1,3435	1,0388
10	1,3545	1,0756
15	1,3645	1,1091
20	1,3735	1,1392
25	1,3842	1,1751
30	1,3945	1,2096
35	1,4045	1,2464
40	1,4155	1,2799
45	1,4270	1,3185
50	1,4380	1,3553

Tab. 2: Aufstellung der korrespondierenden Dichte- und Brechungsindex-Werte von Metrizamid in TEN in 5%-(Gew.-%)-Schritten.

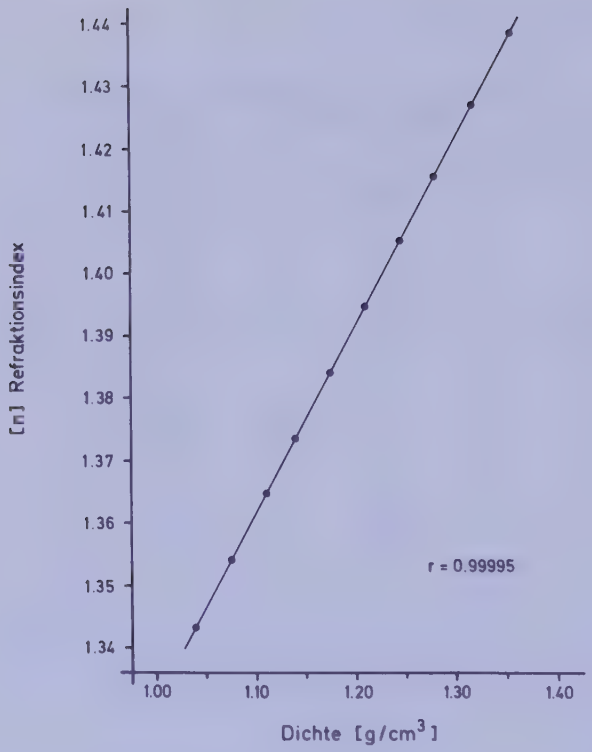


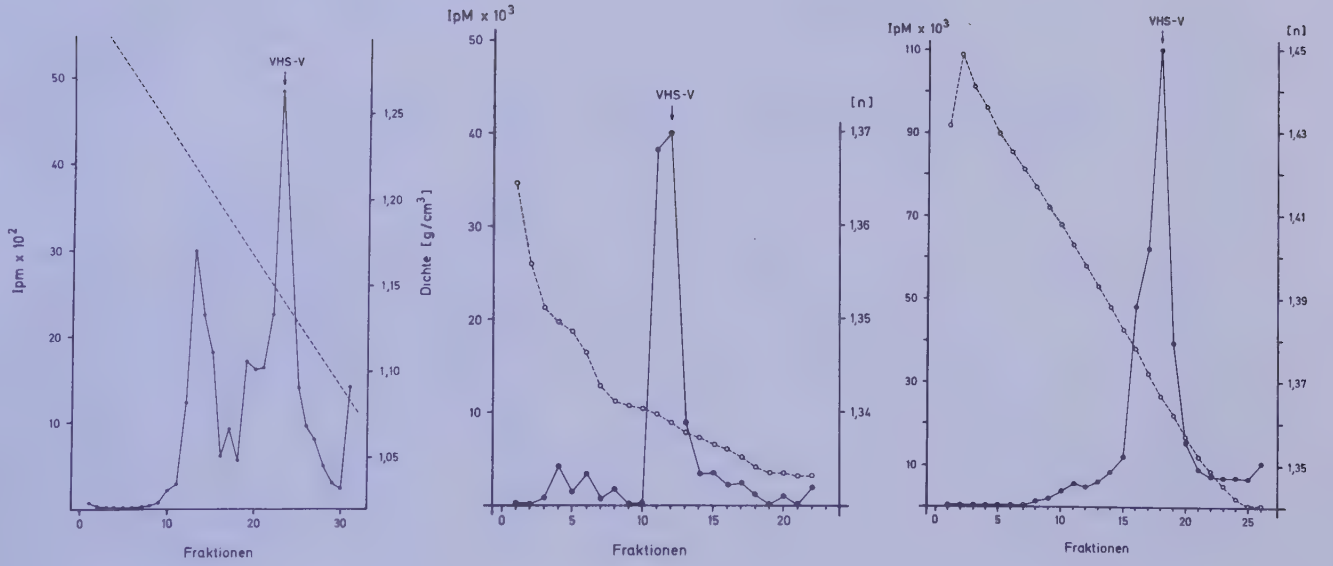
Abb. 4: Eichkurve zur Dichtebestimmung von Metrizamidgradienten

4.1.2 Zusammenfassung der ermittelten Dichtewerte

In Abbildung 5 ist die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Dichtegradienten dargestellt.

Während im Sucrosegradienten zusätzlich zum Virusgipfel

weitere, auf "Virus-Bruchstücke" zurückzuführende, radioaktiv markierte Fraktionen auftreten, liefern die Percoll- und Metrizamidgradienten scharfe Virusgipfel ohne nennenswerte Verunreinigungen.



a) Sucrose b) Percoll c) Metrizamid

Abb. 5: Dichtegradienten-Zentrifugation von VHS-V. Verteilung der Radioaktivität in den verwendeten Dichtegradienten.

Infolge der positiven Ergebnisse aus der Gleichgewichtszentrifugation im Metrizamidgradienten - hohe Linearität des Gradienten und eine scharfe Virusbande ohne wesentliche Verunreinigungen - wurde für die folgenden Untersuchungen ausschließlich die Gleichgewichtszentrifugation im Metrizamidgradienten angewendet.

Der Einfluß der Dichtemedien auf die Schwebedichte der Viruspartikel wird durch das im Percollgradienten erhaltene Ergebnis untermauert. Die Aussage (siehe 2.5.5.2), daß Percoll keine biologischen Membranen durchdringt und somit die Schwebedichte von Partikeln während der Zentrifugation nicht ändert, wird durch die deutlich niedrigeren Dichtewerte bestätigt.

Die ermittelten Dichtewerte für VHS-V und SVC-V sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Gradient	Dichte [g / cm^3]	
	VHS-V	SVC-V
Sucrose	1,145	1,150
Percoll	1,029	1,031
Metrizamid	1,117	1,154

Tab. 3: Dichte des VHS-V und SVC-V im Sucrose-, Percoll- und Metrizamidgradienten.

4.2 Molekulargewichtsbestimmung der Virus-Proteine im diskontinuierlichen Polyacrylamid-Flachgel

Bei der Flachgel-Elektrophorese wurden jeweils 60.000 - 80.000 IpM des Probenmaterials pro Geltasche eingesetzt. Die aus den Markierungen mit L-[^{75}Se]-Selenmethionin stammenden und über 10-60%igen (Gew.-% in TEN) Metrizamidgradienten gereinigten Virussuspensionen (siehe 3.2.5.3) wurden mit gleichen Teilen Probenpuffer versetzt und für zwei Minuten auf 100°C erhitzt. Dadurch wurden die Virusproteine separiert und denaturiert. Als Molekulargewichts-Marker dienten die mit ^{125}Iod markierten Proteine des Elektrophorese-Eichkits für hochmolekulare Proteine (siehe 3.2.6.1.1). Nach einer Laufdauer von ca. zwei Stunden wurden die Gele gefärbt, getrocknet und nach 3.2.9.2.1 beziehungsweise 3.2.9.3 ausgewertet. In früheren Arbeiten (Deuter, 1981) konnte in einer vergleichenden Elektrophorese zwischen gefärbten nicht radioaktiv markierten Markerprotein-Banden und den in der Autoradiographie aufgetretenen Banden kein Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit festgestellt werden.

Die Abbildung 6 zeigt als Beispiel für alle Auswertungen eine Eichkurve zur Ermittlung der Molekulargewichte.

In Abbildung 7 ist das typische Bild einer Autoradiographie der Virusproteine von VHS-V und SVC-V sowie die Re-Elektrophorese des N-Proteins von VHS-V dargestellt. Dieses N-Protein wurde nach 4.3 in der Röhrchengel-Elektrophorese erhalten. Des N-Protein-haltige Gelscheibchen wurde in eine Geltasche des obigen Gels gelegt und mit 60 µl Probenpuffer versetzt. Um die Molekulargewichte direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Elektrophorese der viralen Proteine in

jeweils einem Gel durchgeführt. Nur so können versuchsbedingte Unterschiede ausgeschlossen werden.

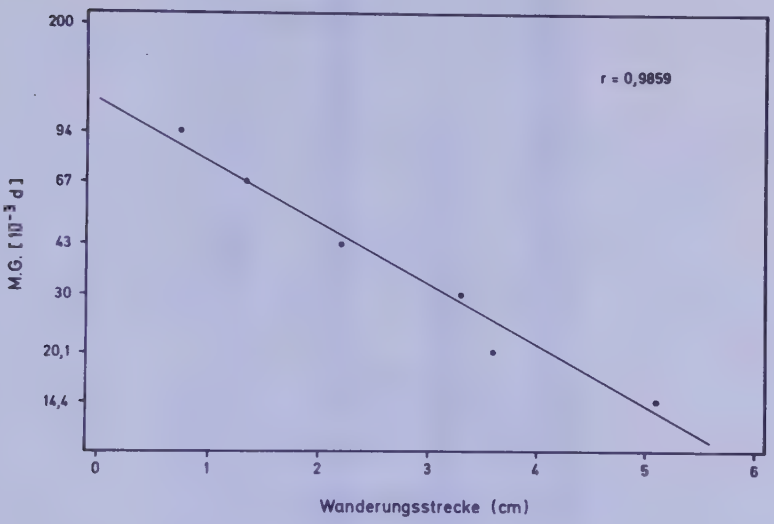


Abb. 6: Eichkurve zur Bestimmung der Molekulargewichte viraler Proteine

Als Marker wurden mit ^{125}Iod markierte Proteine benutzt. Molekulargewicht in kilodalton der Markerproteine:

Protein	
Phosphorylase b	94
Bovine Serum Albumin	67
Ovalbumin	43
Carbonic Anhydrase	30
Soybean Trypsin Inhibitor	20.1
Alpha Lactalbumin	14.4

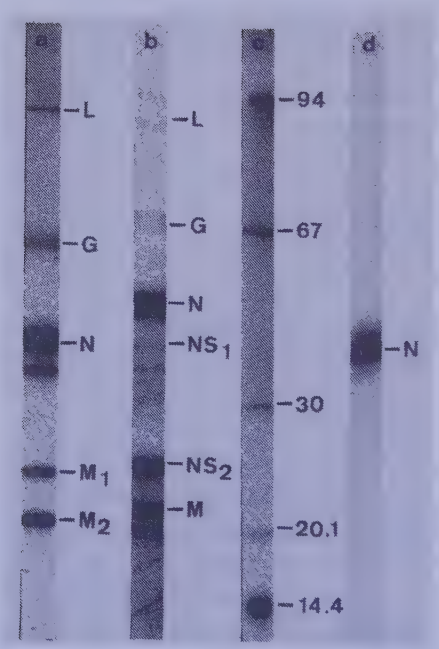


Abb. 7: Autoradiographie einer Flachgel-Elektrophorese viraler Proteine und einer Re-Elektrophorese des N-Proteins von VHS-V

a) VHS-V
b) SVC-V
c) Marker
d) Re-Elektrophorese des N-Proteins

Beim VHS-V treten deutlich die Proteine L, G, N, M_1 und M_2 auf, beim SVC-V die Proteine L, G, N, NS_1, NS_2 und M. Bei den zusätzlichen, nichtbezeichneten Proteinen handelt es sich vermutlich um markierte Zellproteine, die bei den Viruspräparationen unregelmäßig auftreten.

Die SVC-V-Proteine sind wesentlich geringer markiert als die VHS-V-Proteine. Auf dieses Problem wird später noch hingewiesen.

Das re-elektrophoretisierte N-Protein des VHS-V weist die gleiche Wanderungsstrecke auf wie das N-Protein in der Virus-Proteinmischung.

Dies ist ein Beweis für die hohe Reproduzierbarkeit des Systems und zeigt den Vorteil der L-[^{75}Se]-Selenmethionin-Markierungsmethode gegenüber Markierungen mit Beta-Strahlern; dabei kann das Gelscheibchen nach Messung der Beta-Strahlung nicht für weitere Versuche verwendet werden.

In Tabelle 4 sind die ermittelten Molekulargewichte der Proteine von VHS-V und SVC-V aufgeführt.

Protein	L	G	N	NS_1	NS_2	M_1	M_2	M
VHS-V	> 90	63	42	—	—	24	20	—
SVC-V	> 90	73	50	39	26	—	—	22

Tab. 4: Molekulargewichte der Proteine des VHS-V und SVC-V in kilodalton

Alle Werte wurden in einem Gel unter identischen Bedingungen ermittelt.

Legt man die Einteilung der Rhabdoviridae nach Matthews, 1982 (siehe 1.3.4) zugrunde, ist das VHS-V mit seinen Proteinen L, G, N, M_1 und M_2 dem Rabies-

Virus-Typ und das SVC-V mit seinen Proteinen L, G, N, NS_1, NS_2 und M bedingt dem VSV-Typ zuzuordnen. Die Einschränkung beim SVC-V muß wegen des Auftretens eines zweiten NS-Proteins gemacht werden, dessen Funktion und Herkunft bisher noch nicht bekannt waren.

Die Molekulargewichte der L-Proteine wurden mit größer als 90 kilodalton angegeben, da sie, wie in Abb. 7 dargestellt, oberhalb des Markerproteins mit 94 kilodalton liegen. Auf die Angabe der ermittelten Molekulargewichte wurde daher bewußt verzichtet, da dies als zu ungenau erschien. Proteine mit einem so hohen Molekulargewicht liegen im verwendeten Gelsystem in der halblogarithmischen Darstellung nicht mehr auf einer Geraden.

4.3 Röhrchengel-Elektrophorese

Die Röhrchengel-Elektrophorese wurde angewendet, um die radioaktiv markierten Virusproteine präparativ aufzutrennen. Die ermittelten Virusprotein-haltigen Scheibchen wurden dann für die limitierte Proteolyse (3.2.10.1) verwendet.

Von den wie oben behandelten Proben wurden Aliquote mit 250.000-300.000 IpM aufgetragen. Als Molekulargewichts-Marker dienten ebenfalls die schon beschriebenen, mit ^{125}Iod markierten Proteine. Die Laufzeit betrug ca. 90 Minuten bei einer Stromstärke von 2,5 mA/Röhrchen im Konzentriergel und 5 mA/Röhrchen im Trenngel.

Anschließend wurde das Gel aus dem Röhrchen herausgelöst, in 1,5 mm dicke Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität in den einzelnen Scheibchen bestimmt.

In Abbildung 8 sind die Elektropherogramme der Proteine von VHS-V und SVC-V dargestellt.

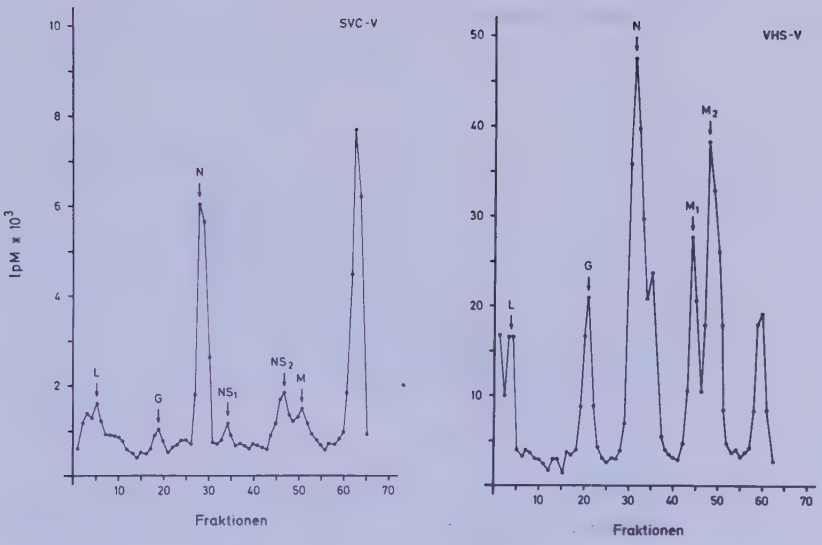


Abb. 8: Elektropherogramme der viralen Proteine von SVC-V und VHS-V in der Röhrchengel-Elektrophorese.

Die mit dieser Methode (hier nicht dargestellt) ermittelten Molekulargewichte stimmen in der Größenordnung mit denen aus der Flachgel-Elektrophorese überein. Sie unterliegen aber größeren statistischen Schwankungen, die sich daraus erklären lassen, daß beim Schneiden der Röhrchengele geringfügige Verschiebungen auftreten.

4.4 Doppelgradienten-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen mit Molekulargewichten kleiner als 20 kd und geringen Molekulargewichts-Unterschieden wurde das unten beschriebene Doppelgradienten-Gelsystem entwickelt.

Die in diesem System vorherrschenden Bedingungen sind in Abbildung 9 dargestellt.

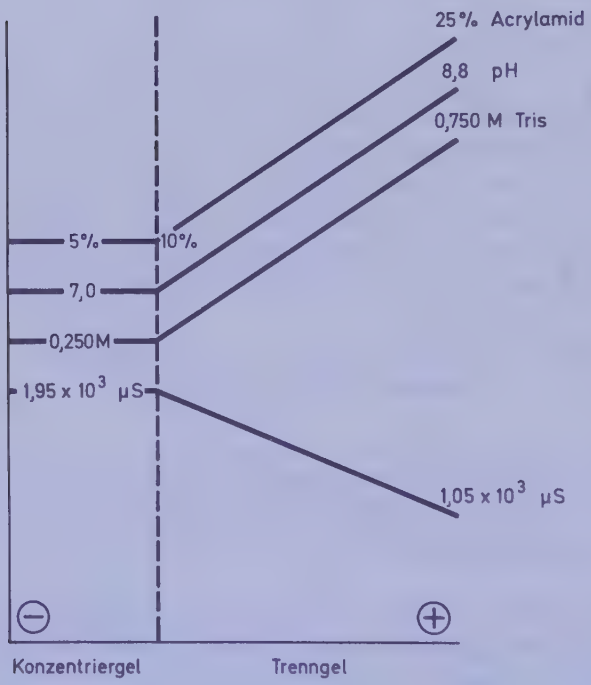


Abb. 9: Aufbau des Doppelgradienten-Gelsystems: Acrylamidgradient von 5-25% (Gew.-%), pH-Gradient von 7,0-8,8, Tris-Gradient von 0,25M bis 0,75M; bedingt durch den pH-Gradienten sinkt die Leitfähigkeit im System ab (geringere Dissoziation bei höherem pH-Wert).

Bei diesem System wird die Funktion des Konzentriergels durch einen beginnenden Gradienten aus Acrylamid und

Tris-HCl fortgesetzt. Der Tris-HCl-Gradient bewirkt einen pH-Gradienten von pH 7,0 bis pH 8,8 und, bedingt durch die geringere Dissoziation des Tris-HCl bei höherem pH-Wert, einen absteigenden Leitfähigkeitsgradienten. Der pH-Wert am Anfang des Trenngels entspricht dem des Konzentriergels und steigt dann langsam an. Dadurch bleibt noch einige Zeit der Schubeffekt der hinter den Proteinen wandernden $Glycin^-$-Ionen bestehen, wodurch ein tieferes Eindringen der Proteinmoleküle in das Gradientengel bewirkt wird. Erst allmählich können die $Glycin^-$-Ionen durch die beginnende pH-Änderung das Protein überholen und von diesem Moment an beginnt die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße im Gel.

Der Vorteil des Doppelgradienten-Systems gegenüber dem gebräuchlichen Gradientengel wird aus dem Ergebnis des unten beschriebenen Experiments ersichtlich.

Je 60 µl einer Kombination aus ^{125}I-markierten Proteinen (3.2.6.1.1) des Molekulargewichts-Bereiches 14.4 - 94 kd sowie einer ^{14}C-methylierten Proteinmischung (bezogen von der Fa. Amersham Buchler) im Bereich 2.35 - 30 kd wurden a) auf ein Doppelgradienten-Gel und b) auf ein herkömmliches Gradientengel gegeben und nach der Elektrophorese, wie in 3.2.10.1 beschrieben, ausgewertet.

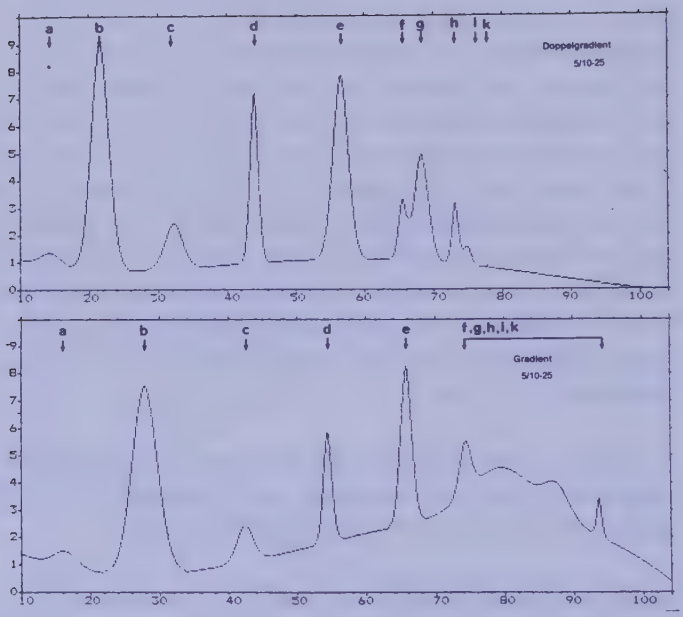


Abb. 10: Computer-Auswertung der Wanderungsstrecke der Markerproteine im Doppelgradienten- und im herkömmlichen Gradientengel:

^{125}I-markierte Proteine

a)	Phosphorylase b	94	kd
b)	Albumin	67	kd
c)	Ovalbumin	43	kd
d)	Carbonic Anhydrase	30	kd
e)	Trypsin Inhibitor	20.1	kd
g)	α-Lactalbumin	14.4	kd

^{14}C-methylierte Proteine

d)	Carbonic Anhydrase	30	kd
e)	Trypsin Inhibitor	21.5	kd

f)	Cytochrom C	12.5 kd
h)	Aprotinin	6.5 kd
i)	Insulin-Kette A	3.4 kd
k)	Insulin-Kette B	2.35 kd

Die Abbildung 10 zeigt die Computer-Auswertungen, aus denen ersichtlich ist, daß das hier entwickelte Doppelgradienten-System gegenüber dem herkömmlichen Gradientensystem eine wesentlich bessere Auflösung im Molekulargewichts-Bereich kleiner als 20 kd liefert.

Durch die hohe Auflösung des verwendeten Systems, dies gilt sowohl für das neu entwickelte Gelsystem als auch für die Computerauswertung, wird im Molekulargewichts-Bereich 12 - 14 kd ein Effekt deutlich, der bei höheren Molekulargewichten noch nicht zu erkennen ist. Das von Amersham Buchler bezogene mit 12,5 kd angegebene, ^{14}C-methylierte Cytochrom C wandert gegenüber dem selbst mit ^{125}I markierten α-Lactalbumin, das mit 14,4 kd angegeben wird, wesentlich langsamer. Es konnte bisher noch nicht erklärt werden, worauf dieser Effekt begründet ist.

Trägt man in der halblogarithmischen Darstellung die oben ermittelten Wanderungsstrecken gegen die korrespondierenden Molekulargewichte auf, so erhält man eine sigmoide Kurve (Abb. 11), da im oberen Gelbereich infolge der größeren Porengröße im Gel der Molekularsieb-Effekt schwächer ist.

In kleinen Bereichen, wie zum Beispiel 14 - 70 kd beziehungsweise 2 - 7 kd lassen sich annähernd lineare Beziehungen aufstellen, wie es die Berechnung der Regressionsgeraden und der daraus resultierenden Korrelationskoefizienten für diese Bereiche zeigt.

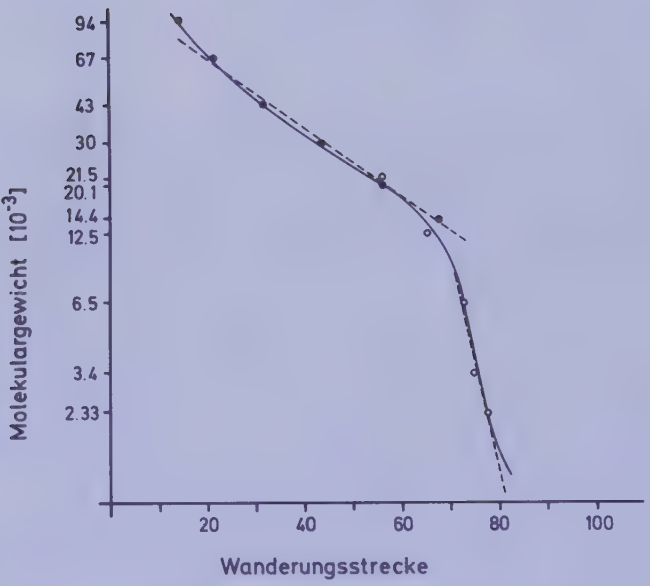


Abb. 11: Halblogarithmische Darstellung der Wanderungsstrecken der verwendeten Markerproteine im Doppelgradienten-Gelsystem.

_____: Gesamtverlauf
---------: Bereiche der annähernden Linearität

4.5 Die Peptidmuster der Virusproteine nach der limitierten Proteolyse

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich die zwei Virusstämme VHS-V und SVC-V nicht so stark unterscheiden, wie aufgrund der Literaturangaben zu erwarten war.

Die aufgezeigte Ähnlichkeit wurde weiter mit Hilfe der limitierten Proteolyse einzelner viraler Proteine untersucht.

Setzt man die viralen Proteine in begrenzter Zeit einer definierten Menge an Protease aus, so erhält man Peptide, die aufgrund der Primärstruktur der Ausgangsproteine eine spezifische Länge haben. Die für die eigenen Versuche benutzten optimalen Protease-Konzentrationen und Inkubationszeiten müssen festgelegt und für die weiteren Versuche streng eingehalten und kontrolliert werden.

Ein Beispiel für die aus der nach 3.2.10.1 durchgeführten limitierten Proteolyse erhaltenen Peptidmuster zeigt Abbildung 12.

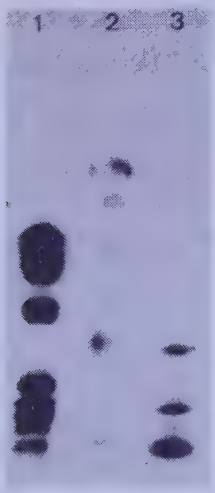


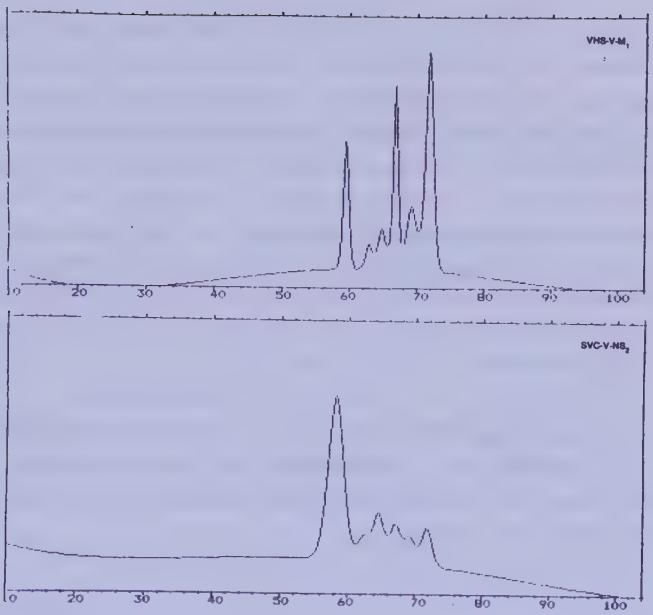
Abb. 12: Autoradiographie der Peptidmuster von Virusproteinen nach Durchführung der limitierten Proteolyse mit V8-Protease.

1 Peptide des N-Proteins von VHS-V
2 Peptide des G-Proteins von SVC-V
3 Peptide des M_1-Proteins von VHS-V

Die Effizienz der radioaktiven Markierung war bei den Proteinen des SVC-V deutlich geringer als bei den Proteinen des VHS-V. Infolgedessen traten bei den Peptidmustern der SVC-V-Proteine wesentlich schwächere Banden auf, die visuell teilweise kaum noch auszumachen waren (Abb. 12, Spur 2).

Aus diesen Gründen erfolgte die Auswertung der Gele mit dem Laser-Densitometer 2202 Ultroscan von LKB und dem Apple IIe Computer.

In Abbildung 13 ist repräsentativ eine derartige Auswertung dargestellt.



Peak #	Position	Intensity * 1.000	Intensity %
1	59.5	161.9	16.6
2	62.9	31.3	3.2
3	64.8	67.5	6.9
4	66.8	205.2	21.0
5	69.2	135.0	13.8
6	71.9	374.1	38.4

VHS-V-M_1

Peak #	Position	Intensity * 1.000	Intensity %
1	58.2	331.1	57.0
2	62.4	35.2	6.1
3	64.6	68.8	11.9
4	67.1	54.2	9.3
5	69.3	37.5	6.5
6	71.8	53.9	9.3

SVC-V-NS_2

Abb. 13: Computer-Diagramme der Peptidmuster nach der limitierten Proteolyse mit Trypsin. Dargestellt sind die Peptidmuster des M_1-Proteins von VHS-V und des NS_2-Proteins von SVC-V.

oben: Diagrammauswertung
unten: berechnete Gipfel-Positionen

Die Lage der Peptidgipfel ist in Abbildung 13, unten, in Skalenteilen angegeben. Der erste Gipfel entspricht jeweils dem Ausgangsprotein. Als identisch wurden alle Peptide angesehen, deren ausgewertete Wanderungsstrecke kleinergleich 0,2 Skalenteile, also 0,2% Unterschied, aufwiesen. Dies entspricht 800 d im oberen und 400 d im unteren Molekulargewichtsbereich. In dem dargestellten Bespiel: Vergleich der Peptidmuster des SVC-NS_2-Proteins und des VHS-M_1-Proteins, treten nach obiger Definition drei identische Peptide, nämlich die Peptide 3, 5 und 6 auf.

In der nächsten Abbildung ist die Computerauswertung des Vergleichs der Peptidmuster der G-Proteine von VHS-V und SVC-V gezeigt, die eine weitaus geringere Verwandtschaft zeigen.

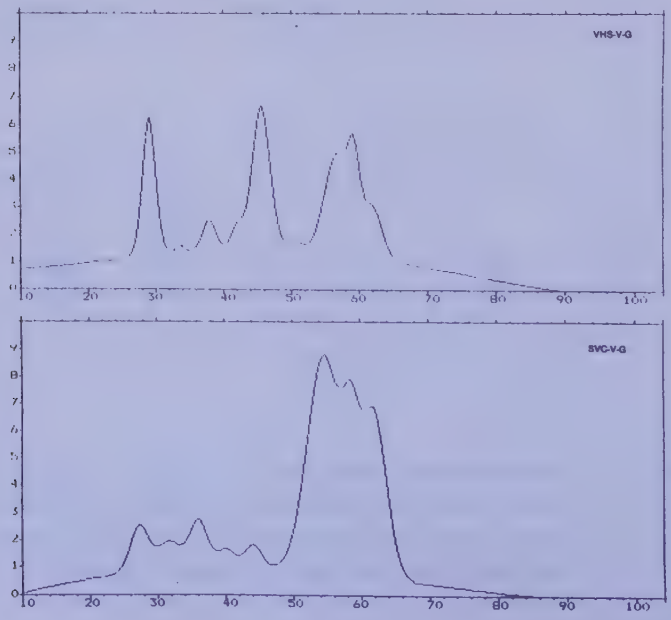


Abb. 14: Computer-Diagramme der Petidmuster nach der limitierten Proteolyse mit V8. Dargestellt sind die Peptidmuster der G-Proteine von VHS-V (oben) und SVC-V (unten).

Von den zehn Peptiden des G-Proteins von VHS-V und den acht Peptiden des G-Proteins von SVC-V können nur zwei Peptide als identisch betrachtet werden.

In Tabelle 5 sind die gesamten Ergebnisse der limitierten Proteolyse zusammenfassend dargestellt.

Virusproteine	A	B	C
VHS-M_2 SVC-M (V8)	4	2	6
VHS-M_1 SVC-NS_2 (Tr)	6	3	6
VHS-G SVC-G (V8)	10	2	8
VHS-G SVC-G (Tr)	8	1	12
VHS-N SVC-N (V8)	8	2	6
VHS-N SVC-N (V8)	8	2	6
VHS-N SVC-N (Tr)	8	1	6

Tab. 5: Vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse der limitierten Proteolyse. Dargestellt sind die Anzahl der aufgetretenen und der identischen Proteine.

A: Gesamtzahl der Peptide der VHS-V-Proteine
B: Zahl der identischen Peptide
C: Gesamtzahl der Peptide der SVC-V-Proteine

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß beim Vergleich des VHS-M_1-Proteins mit dem SVC-NS_2-Protein die höchste Verwandtschaft bei drei von insgesamt sechs Peptiden auftritt.

Zwischen den Proteinen VHS-M_2 und SVC-M treten zwei identische Peptide von vier (VHS-V) beziehungsweise sechs (SVC-V) auf, was auf eine schwächere Verwandtschaft beider Proteine hinweist.

Bei der Gegenüberstellung der N-Proteine von VHS-V und SVC-V ist die Verwandtschaft noch weniger ausgeprägt. Beim Abdau mit der Protease V8 (St. aureus) treten zwei identische bei acht (VHS-V) beziehungsweise sechs (SVC-V) Peptiden insgesamt auf.

Bei den G-Proteinen des VHS-V und SVC-V wurde die geringste Verwandtschaft festgestellt.

Die Tatsache, daß bei den zwei dargestellten Proteolysen mit Protease V8 (St. aureus) das exakt gleiche Ergebnis auftrat, weist auf die gute Reproduzierbarkeit des angewendeten Systems und der gewählten Bedingungen hin.

Vergleicht man die Ergebnisse, die an gleichen Proteinen mit zwei verschiedenen Proteasen, Trypsin und V8 erhalten wurden, so wird das Auftreten unterschiedlicher Peptidmuster deutlich. Dies ist auf die verschiedenen Schnittstellen der Proteasen zurückzuführen.

Ein Vergleich des SVC-N-Proteins mit dem SVC-NS_1-

Protein (da es sich dabei nicht um einen Vergleich des VHS-V mit dem SVC-V handelt, sind diese Ergebnisse nicht in Tabelle 5 aufgeführt) ergab, daß alle NS_1-Peptide (4) im N-Protein vorhanden sind, das zusätzlich über zwei weitere Peptide verfügt.

Über die L-Proteine können keine Aussagen gemacht werden. Infolge der schwachen Markierung der SVC-V-Proteine traten bei der limitierten Proteolyse des L-Proteins von SVC-V keine auswertbaren Banden mehr auf.

4.6 Radioimmun-Präzipitation (RIP)

Von den nach 3.2.12 erhaltenen Radioimmun-Präzipitaten aus VHS-V (Antigen) und monospezifischen Immunseren gegen einzelne VHS-V Proteine wurden Aliquote mit ca. 80.000 IpM auf ein diskontinuierliches 10%iges (Gew.-%) Polyacrylamid-Gel gegeben. Die Elektrophorese und Auswertung erfolgte wie in 3.2.9.3 beschrieben.

Die Ergebnisse der RIP sind zusammengefaßt in Tabelle 6 aufgeführt.

	L	N	M_1	M_2
Anti-L	**L**	N	M_1	—
Anti-N	L	**N**	—	M_2
Anti-M_1	—	—	**M_1**	—
Anti-M_2	L	N	—	**M_2**

Tab. 6: Ergebnisse der RIP

Dargestellt sind die nachgewiesenen Radioimmun-Präzipitate von VHS-V (Antigen) gegen VHS-V-monospezifische Antikörper

Die monospezifischen Antiseren gegen einzelne Virusproteine führen in der homologen Reaktion zur Präzipitation des entsprechenden Antigens (in Tab. 6 im Fettdruck dargestellt). Außer diesen Präzipitationen waren aber noch wesentlich schwächere Reaktionen mit verschiedenen heterologen Antigenen nachzuweisen. Dies ist dadurch bedingt, daß die Immunreaktion nicht unter "strikten" Bedingungen durchgeführt wurde. Dies bedeutet, daß außer den spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen noch andere Wechselwirkungen zwischen den Virusproteinen möglich sind.

Das Anti-L-Serum zeigt eine Affinität zum N- und M_1-Protein. Dies bestätigt die schon früher gemachte Aussage, daß das RNP des VHS-V die Proteine L, N und M_1 beinhaltet (Deuter, 1981, Enzmann et al., 1981).

Die monospezifischen Seren gegen die Proteine N und M_2 weisen neben der homologen Reaktion auf eine Affinität des N-Proteins zum M_2-Protein hin, da im Präzipitat des Anti-N-Serums neben dem N-Protein auch noch in geringerem Maße das M_2-Protein und auch das L-Protein nachzuweisen ist und im Präzipitat des Anti-M_2-Serums neben dem M_2-Protein noch das N- und das L-Protein vorkommen.

Diese Reaktionen geben einen Hinweis auf die Funktion des M_2-Proteins. Dieses stellt als Bestandteil des inneren Blattes der Doppelmembran die Verbindung zum RNP her, was beim Reifungsprozeß des Virus (budding) an der Zellmembran ein Erkennungssignal für den RNP-Komplex darstellt.

4.7 Gegenstrom-Immunelektrophorese mit VHS-V und SVC-V

Bei der Gegenstrom-Immunelektrophorese wandert das Antigen im elektrischen Feld in Richtung Anode. In der entgegengesetzten Richtung fließen die Antikörper im elektroendosmotischen Pufferstrom, der bei der Elektrophorese in einer entsprechend definierten Agarose (hohe Elektroendosmose) entsteht. In der Äquivalenz-Zone zwischen Antigen- und Antikörper-Depot gibt es eine Präzipitationslinie aus Antigen und Antikörper. Die Reaktion ist wesentlich sensitiver als die Immundiffusion, weil das gesamte vorhandene Antigen (beziehungsweise Antikörper) in der Präzipitationslinie gebunden wird, und nicht, wie bei der radialen Immundiffusion, nur in einem eng begrenzten Kreisausschnitt auf die Antikörper trifft.

In Abbildung 15 ist die Autoradiographie nach einer solchen Gegenstrom-Immunelektrophorese dargestellt.

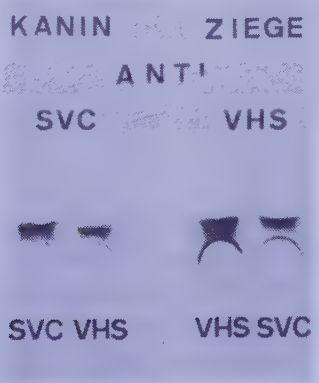


Abb. 15a: Autoradiographie nach der Gegenstrom-Immunelektrophorese

a) Antigen- und Antikörper-Depot einander gegenüber liegend;

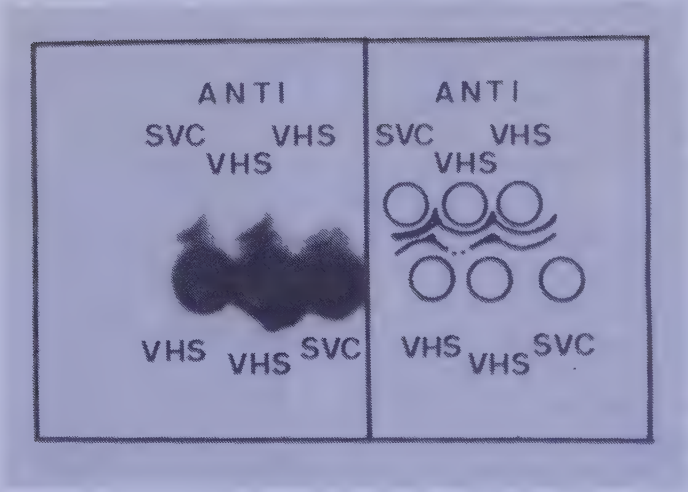


Abb. 15b: Autoradiographie nach der Gegenstrom-Immunelektrophorese

b) Antigen- und Antikörper-Depot versetzt angeordnet;

links: Original-Autoradiographie,
rechts: Skizze der Präzipitatbanden.

Die Antigen- beziehungsweise Antikörper-Depots sind in Abb. 15 a) wie üblich einander gegenüber angeordnet. VHS-V-Antigen und SVC-V-Antigen reagieren sowohl mit Anti-VHS-V Immunserum als auch mit Anti-SVC-V Immunserum. Die heterologe Reaktion ist jeweils schwächer als die homologe Reaktion. Bei dieser Anordnung von Antigen- und Antikörper-Depot kann man lediglich eine positiv-negative Aussage treffen: VHS-V Antigene (SVC-V) reagieren außer mit dem homologen Serum auch mit dem heterologen Anti-SVC Immunserum

(VHS-V). Über eine direkte Verwandtschaft der Antigene, d.h. daß verschieden Epitope auf dem Antigen identisch sind, ist damit nichts ausgesagt. Ordnet man Antigen- und Antikörper-Depot versetzt an, wie es in Abbildung 15 b) gezeigt ist, erhält man Präzipitationslinien, die ineinander übergehen. Dies ist ein Hinweis für eine direkte Verwandtschaft eines Antigens.

4.8 Elektro-Immundiffusion (nach Laurell)

Mit einer weiteren Technik, der Elektro-Immundiffusion, (auch "Rocket-Elektrophorese" genannt), konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Im elektrischen Feld wandert das Antigen zur Anode und hinterläßt bei dieser Wanderung durch das Antikörper-haltige Agarose-Gel eine Präzipitatspur, die auch quantitativ ausgewertet werden kann. In Abbildung 16 ist die Autoradiographie eines solchen Versuches gezeigt.

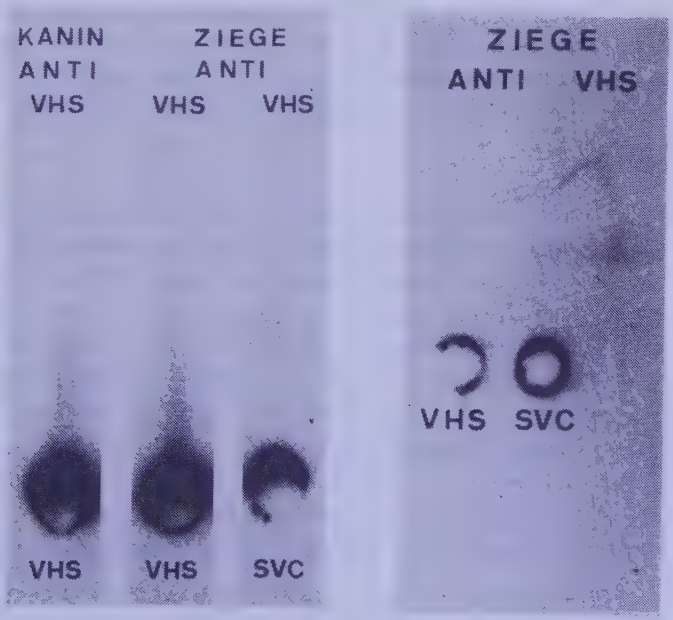


Abb. 16: Autoradiographie nach der Elektro-Immundiffusion
a) Präzipitatspur von VHS- bzw. SVC-Antigen in Anti-VHS-Serum-haltigem Agarose-Gel;

b) Tandem-Elektrophorese;
1. Dimension: Auftrennung der Antigene von links nach rechts;
2. Dimension: Präzipitatspur von VHS- bzw. SVC-Antigen in Anti-VHS-Serum-haltigen Agarose-Gel.

Sowohl VHS-V als auch SVC-V hinterlassen in der Agarose mit Anti-VHS-V Immunserum eine Präzipitatspur. Da bei beiden Antigenen eine gleiche Menge an Radioaktivität eingesetzt worden war, ist aus der längeren und schwächeren Präzipitatspur, die SVC-V hinterlassen hat, zu schließen, daß im Anti-VHS-V Serum weniger Antikörper zur Reaktion gegen SVC-V befähigt sind als gegen VHS-V. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß nicht alle Strukturproteine von VHS-V und SVC-V miteinander verwandt sind, sondern nur wenige oder nur eines.

Mit der zweidimensionalen Technik kann man auch hier wieder zusammenfließende Linien erhalten (Abbildung 16b). Man läßt die verschiedenen Antigene im Abstand von 5-6 mm hintereinander in einem reinen Agarose-Gel in Richtung Anode wandern, dreht dann die Platte um 90° und läßt die Antigene nun in ein Antikörper-haltiges Gel einwandern. Bei der elektrophoretischen Wanderung in der ersten Dimension fließen die zwei verschiedenen Antigene teilweise ineinander über und hinterlassen bei ihrer Wanderung durch das Antikörper-haltige Gel in der zweiten Dimension eine ineinanderfließende Linie, falls

eine Antigen-Verwandtschaft vorliegt. Auch bei diesem Versuch (Abb. 16) ist ein quantitativer Unterschied zwischen VHS-V und SVC-V festzustellen wie in Abbildung 15. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, daß ein gemeinsames Antigen bei VHS-V und SVC-V vorhanden ist.

5. DISKUSSION

Die beiden Virusarten VHS-V und SVC-V werden aufgrund ihrer Morphologie der Familie Rhabdoviridae zugeordnet. Nach Matthews (1982), wird diese Familie in das Genus Vesiculovirus, das Genus Lyssavirus und die Gruppe der Pflanzen-Rhabdoviren unterteilt. In der Literatur findet man über die Proteinmuster von VHS-V und SVC-V sehr verwirrende Angaben (Siehe Tabelle 1). Die angegebenen Molekulargewichte aller Proteine beider Virusarten schwanken stark. Die Angaben für das NS-Protein des SVC-V sind sogar widersprüchlich. Dieses Protein wird bei einigen Autoren (z.B. Lenoir, 1973, 1975) entweder gar nicht erwähnt, oder es werden Molekulargewichte angegeben, die größer als diejenigen des N-Proteins sind (Clerx, 1978).

Unter anderem konnten aufgrund dieser Unstimmigkeiten die beiden Virusarten VHS-V und SVC-V bisher noch nicht endgültig einem Genus zugeordnet werden. Daher haben sie bisher nur den Status eines möglichen Mitglieds der Familie Rhabdoviridae (Matthews, 1982). Auch über den Verwandtschaftsgrad zwischen VHS-V und SVC-V konnten bisher keine näheren Angaben gemacht werden.

Da beide Virusarten in Fischen sehr ähnliche Krankheitsbilder verursachen, war es von Interesse, beide biochemisch und serologisch vergleichend zu untersuchen.

Schon zu Beginn der Untersuchungen zeigte sich, daß das Arbeiten mit dem SVC-V wesentlich problematischer war, als mit dem VHS-V. Zum einen war die Effizienz der radioaktiven Markierungen des SVC-V wesentlich geringer (Abb. 7); zum anderen erwies sich hauptsächlich das SVC-V in den angewendeten Reinigungsschritten (Sucrosepolster, Dichtegradienten-Zentrifugation in Sucrose)

als sehr labil.

Die osmotischen Belastungen führten zu einer teilweisen Freisetzung des RNP, das heißt zu einem Zerfall des Virions. Es wurde deshalb nach einer schonenderen Reinigungsmethode gesucht.

Durch die Verwendung von Percoll und Metrizamid, Dichtemedien mit inerten Eigenschaften und geringer Osmolalität, gelang es, bessere Ergebnisse bei der Virusreinigung zu erhalten.

In Tabelle 3 sind zusammenfassend die Ergebnisse der Dichtebestimmungen in allen drei Dichtemedien aufgeführt. Die in Sucrosegradienten ermittelten Dichtewerte stimmen mit denen in der Literatur überein. So berichtet de Kinkelin (1972) über eine Dichte für das VHS-V von 1,14-1,16 g/cm^3 und Lenoir (1973) ebenfalls 1,14-1,16 g/cm^3 für das SVC-V. Literaturangaben über die Verwendung von Percoll und Metrizamid liegen nicht vor. Für die weiteren biochemischen und serologischen Untersuchungen wurden nur noch Metrizamidgradienten verwendet.

Die in der diskontinuierlichen Flachgel-Elektrophorese ermittelten Molekulargewichte für die viralen Strukturproteine sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus mehreren Proteintrennungen in Polyacrylamid-Gelen, wobei der Vergleich VHS-V mit SVC-V jeweils im selben Gel erfolgte, so daß identische Bedingungen vorlagen. Nur so ist ein direkter Vergleich der Molekulargewichte bei den Strukturproteinen beider Virusarten möglich. Wie die Tabelle zeigt, sind die Unterschiede zwischen SVC-V und VHS-V nicht so groß, wie aus den Literaturwerten zu erwarten war. Die Bezeichnung der Strukturproteine (Abb. 7) mit L, G, N, M_1 und M_2 beim VHS-V und mit L, G, N, (NS_1), NS_2 und M

(auf das NS_1 wird weiter unten noch näher eingegangen) erfolgte in Anlehnung an Matthews (1982). Somit könnte vorerst das VHS-V dem Genus Lyssavirus und das SVC-V dem Genus Vesiculovirus der Familie Rhabdoviridae zugeordnet werden. Eine endgültige Zuordnung kann jedoch erst erfolgen, wenn serologische Kreuzreaktionen mit bereits klassifizierten Vertretern der beiden Genera nachgewiesen werden können.

Im folgenden wird auf weitere methodische Arbeiten eingegangen, die notwendig waren, um die aufgetretenen Probleme zu lösen.

Markierungen mit dem Gammastrahler ^{75}Se, wie sie bei den radioaktiven Markierungen der Strukturproteine beider Virusarten angewendet wurden, haben gegenüber Markierungen mit Betastrahlern wie zum Beispiel ^{35}S, einige Vorteile. Die Gammaprobe kann direkt im Gamma-Zähler gemessen werden; dadurch entfällt das Zupipettieren chemischer Reagenzien, die zur Vorbereitung der Messung von Betastrahlung notwendig sind, sowie die Zugabe von Szintillationsflüssigkeit. Es werden zum einen zusätzliche Arbeitsgänge eingespart und zum anderen kann nach der Messung der Gammastrahlung die Probe für weitere Versuche verwendet werden.

In Verbindung mit der Röhrchengel-Elektrophorese wird ein weiterer Vorteil deutlich. Die Abbildung 7 zeigt ein radioaktiv markiertes N-Protein aus einem Röhrchengel, welches in einem Flachgel re-elektrophoretisiert wurde. Die Röhrchengel-Elektrophorese kann also bei Anwendung von Markierungen mit Gammastrahlern als präparative Methode für die Isolierung markierter Virusproteine verwendet werden, wobei die erhaltenen Polypeptide bei weiteren Versuchen eingesetzt werden können.

Mit Hilfe der limitierten Proteolyse nach Cleveland (1977) sollte untersucht werden, ob zwischen den sich entsprechenden Strukturproteinen von VHS-V und SVC-V Verwandtschaftsbeziehungen bestehen und, wenn ja, wie eng diese sind.

Die Auftrennung der erhaltenen Peptide erwies sich in einem herkömmlichen diskontinuierlichen Gradientengel-System im niederen Molekulargewichtsbereich als nicht genügend. In der Autoradiographie waren nur noch kaum definierbare Schleier aufgetreten, die eine Bandenauflösung kaum oder gar nicht erkennen ließen, was für diese Arbeit als zu unbefriedigend erschien.

Es wurde daher ein neues System entwickelt, welches den Namen Doppelgradienten-Gelelektrophorese erhielt. Bei dieser Elektrophorese-Methode wird das nach dem Konzentriergel beginnende, als Acrylamidgradient aufgebaute Trenngel durch einen Salz- und pH-Gradienten unterstützt. Hierdurch bleibt die Funktion des Konzentriergels noch einige Zeit erhalten. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt infolgedessen später als in einem herkömmlichen Gradientengel. Durch die Anwendung dieses für die vorliegende Arbeit neu entwickelten Systems wurde die Auftrennung von kleinen Proteinen mit Molekulargewichten bis zu 2350 d möglich, wie die Abbildung 10 zeigt.

In Kombination mit der Computerauswertung wurde so ein hochauflösendes System geschaffen, mit dessem Hilfe ein Effekt sichtbar wurde, der in den zuvor verwendeten herkömmlichen Gradientengelen nicht nachweisbar war. Das von Amersham Buchler bezogene, mit 12,5 kd angegebene, ^{14}C-methylierte Cytochrom C wandert gegenüber dem selbst mit ^{125}I markierten α-Lactalbumin, das mit 14,4 kd angegeben wird, wesentlich langsamer. Es hätte aber den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, die

Ursachen dieses Effekts herauszufinden.

Die mit dieser Methode aufgetrennten Peptide aus der limitierten Proteolyse (siehe 4.5) zeigen eine starke Verwandtschaft zwischen dem M_1-Protein des VHS-V und dem NS_2-Protein des SVC-V (Abb. 13, Tab. 5); 50% der nachgewiesenen Peptide (drei von sechs) sind als identisch zu betrachten.

Eine etwas schwächere Beziehung besteht zwischen den Proteinen VHS-M_2 und SVC-M (Tab. 5), bei denen zwei der sechs SVC-M-Peptide mit zwei der vier VHS-M_2-Peptide eine entsprechende Ähnlichkeit aufweisen. Auch bei den N-Proteinen konnte auf diese Weise eine Verwandtschaft nachgewiesen werden und zwar sowohl mit der V8-Protease als auch mit Trypsin (Tab. 5). Interessanterweise zeigen auch die G-Proteine eine geringe Verwandtschaft. Dies war aufgrund der größeren Variabilität der Glykoproteide, die dem Angriff der Immunabwehr ausgesetzt sind, nicht erwartet worden. Eine Analyse der L-Proteine war nicht möglich, da infolge der regelmäßig geringeren Markierung des SVC-V verglichen mit dem VHS-V das Peptidmuster des SVC-L-Proteins nicht auswertbar war.

Jedoch scheinen auch die L-Proteine von VHS-V und SVC-V verwandt zu sein, wie andere Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt haben (Enzmann et al., 1981).

Auch hier wird deutlich, daß das SVC-V wesentlich problematischer zu handhaben ist als das VHS-V. Dies könnte allgemein der Grund für die wenigen und widersprüchlichen Literaturangaben über das SVC-V sein (Tab. 1).

Gleichzeitig konnte auch einer dieser Widersprüche aufgeklärt werden. Verschiedentlich wurde über das

Auftreten von zwei NS-Proteinen des SVC-V berichtet (Clerx, 1981), die auch in der vorliegenden Arbeit auftraten und die Bezeichnung NS_1 und NS_2 erhielten.

Alle tryptischen Peptide des NS_1-Proteins sind auch im N-Protein vorhanden, das über zwei zusätzliche Peptide verfügt. Das NS_1-Protein ist somit ein proteolytisches Spaltprodukt des N-Proteins (siehe 4.5).

Ein Hinweis auf diese Tatsache war schon zuvor erhalten worden, indem wiederholt bei der Vermehrung der Zellkulturen für das Ablösen der Einzell-Schichten auf die Verwendung von Trypsin verzichtet worden war. In diesen Fällen war das NS_1-Protein nicht aufgetreten. Somit entsteht das NS_1-Protein aus dem N-Protein durch restliches Trypsin, das beim Vermehren der Zellkulturen eingebracht und nicht mehr vollständig abgespült wird.

Die Vermehrung der Zellen ohne die Verwendung von Trypsin ergab jedoch keine optimalen Zellkulturen, weshalb diese Methode zur Stabilisierung des sehr labilen SVC-V nicht auf Dauer angewandt werden konnte.

Die mit biochemischen Methoden erhaltenen Ergebnisse über die Verwandtschaft von VHS-V und SVC-V konnten durch serologische Methoden ergänzt und bestätigt werden.

In der Gegenstrom-Elektrophorese ist eine Kreuzreaktion zwischen VHS-V und SVC-V nachzuweisen (Abb. 15a). Die heterologe Reaktion zwischen radioaktiv markiertem VHS-V und Anti-SVC-Serum sowie radioaktiv markiertem SVC-V und Anti-VHS-Serum sind jedoch wesentlich schwächer als die homologen Reaktionen. Die in Abbildung 15a gezeigte Anordnung von Antigen- und Antikörper-Depot ergibt einen Hinweis, daß eine Antigen-Verwandtschaft zwischen VHS-V und SVC-V vorliegt.

Wie bei der üblichen Immun-Präzipitation im Agarosegel kann aber auch in der Gegenstrom-Immunelektrophorese bei ineinanderlaufenden Präzipitatlinien eine Aussage über eine direkte Verwandtschaft zweier Antigene gemacht werden, wenn durch eine versetzte Anordnung von Antigen- und Antikörper-Depot dem Antigen die Möglichkeit geboten wird, mit zwei verschiedenen Antiseren (Anti-VHS und Anti-SVC) zu reagieren. Dies wird in Abb. 15b gezeigt.

Bei dieser Technik muß jedoch radioaktiv markiertes Antigen verwendet werden, um eine eindeutige Aussage zu erhalten.

Die Ergebnisse konnten mit einer weiteren serologischen Technik, der Elektro-Immundiffusion, die auch "Rocket-Elektrophorese" genannt wird, bestätigt werden. In Abb. 16 ist ein solcher Versuch gezeigt, der wiederum die Aussage auf eine Kreuzreaktion zwischen VHS-V und SVC-V bestätigt. Durch eine zweidimensionale Elektrophorese-Technik gelang es auch hier, zusammenlaufende Präzipitatlinien zu erhalten. Damit konnte gezeigt werden, daß verwandte Epitope auf dem VHS-V und SVC-V vorhanden sind. Wie bereits erwähnt, war die homologe Reaktion jeweils stärker als die heterologe Reaktion, was zu erwarten war, da nicht zwangsläufig alle Strukturproteine beziehungsweise alle Epitope auf den Strukturproteinen verwandt sein müssen.

Die serologische Methodik bot auch die Möglichkeit, eine Aussage über die Feinstruktur des Virions zu machen. Gegen einzelne Virusproteine waren monospezifische Antiseren bezogen auf die Strukturproteine des VHS-V in Kaninchen hergestellt worden (siehe 3.2.11). Eine mit diesen Seren durchgeführte Radioimmun-Präzipitation ergab, daß außer der

spezifischen Präzipitation des homologen Antigens andere virale Proteine copräzipitiert werden. Dabei zeigt das mittels Anti-L-Serum präzipitierte L-Protein eine Affinität zum N- und M_1-Protein. Dies bestätigt die schon früher gemachte Aussage, daß das RNP des VHS-V die Proteine L, N und M_1 beinhaltet (Deuter, 1981; Enzmann et al., 1981).

Die monospezifischen Seren gegen die Proteine N und M_2 weisen neben der homologen Reaktion auf eine Affinität des N-Proteins zum M_2-Protein hin, da im Präzipitat des Anti-N-Serums neben dem N-Protein auch noch in geringerem Maße das M_2-Protein und auch das L-Protein nachzuweisen sind. Im Präzipitat des Anti-M_2-Serums kommen neben dem M_2-Protein noch das N- und das L-Protein vor.

Diese Reaktionen geben einen Hinweis auf die Funktion des M_2-Proteins. Dieses stellt als Bestandteil des inneren Blattes der Doppelmembran die Verbindung zum RNP her, was beim Reifungsprozeß des Virus (budding) an der Zellmembran ein Erkennungssignal für den RNP-Komplex darstellt. Eine solche Untersuchung war nur mit dem VHS-V möglich. Die schwache radioaktive Markierung des SVC-V ließ bei diesem Virus keine Aussage zu. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß Arbeiten am SVC-V mit Problemen verbunden sind, die beim VHS-V in dieser Form nicht auftreten.

Trotz dieser Probleme kann die Aussage gemacht werden, daß zwischen dem VHS-V und dem SVC-V eine Verwandtschaft besteht.

Aufgrund der Proteinmuster beider Virusstämme wäre eine Eingruppierung des VHS-V in das Genus Lyssavirus und des SVC-V in das Genus Vesiculovirus der Familie Rhabdoviridae möglich. Eine Verwandtschaft zwischen

Angehörigen beider Genera konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Würden das VHS-V und das SVC-V in der genannten Weise eingrupppiert, wären damit zwei verwandte Virusstämme verschiedenen Genera der Familie Rhabdoviridae zugeordnet.

Es bestehen jedoch Bedenken gegen eine solche Eingruppierung, die lediglich aufgrund der Proteinmuster vorgenommen werden würde.

Es erscheint daher als logisch, die Nomenklatur der viralen Proteine zu ändern. Entgegen den Vorschlägen von Cox (1982), der eine Umbenennung der Proteine M_1 in NS und M_2 in M empfahl, wird hier der umgekehrte Weg vorgeschlagen, nämlich NS_2 künftig M_1 und M künftig M_2 zu nennen. Diese Nomenklatur erscheint logischer, da das NS-Protein (Nicht-Struktur) inzwischen als struktureller Bestandteil des Virions erkannt wurde. Für die endgültige Eingruppierung ist auch noch der Nachweis einer serologischen Verwandtschaft zu einem Mitglied von einen der beiden Genera in der Familie Rhabdoviridae notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die fischpathogenen Rhabdoviren VHS-V (virale hämorrhagische Sptikämie der Regenbogenforelle) und SVC-V (spring viraemia of carp) zeigen eine Verwandtschaft, die sich sowohl biochemisch als auch serologisch nachweisen läßt.

Die bisher bekannten, aber widersprüchlichen Daten über die Proteinzusammensetzung wurden in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft und präzisiert. Aufgrund der Ergebnisse könnte das VHS-V dem Genus Lyssavirus und das SVC-V dem Genus Vesiculovirus der Familie Rhabdoviridae zugeordnet werden.

Mit Hilfe der limitierten Proteolyse konnten bei sich entsprechenden Strukturproteinen infolge des Auftretens identischer Peptide Verwandtschaftsbeziehungen festgestellt werden, deren Stärke von M_1-NS_2, M_2-M, N-N nach G-G abnahm. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das NS_1-Protein des SVC-V ein Spaltprodukt des N-Proteins ist.

Eine serologische Verwandtschaft zwischen VHS-V und SVC-V lies sich in der Gegenstrom-Immunelektrophorese und Elektro-Immundiffusion nachweisen.

Eine Radioimmun-Präzipitation, die mit viralen Proteinen und monospezfischen Antiseren gegen einzelne Virusproteine durchgeführt worden war, ergab Erkenntnisse über die Feinstruktur des Virions, was sowohl den Aufbau des Ribonukleoproteins als auch funktionelle Eigenschaften des M_2-Proteins beim Reifungsprozeß betrifft.

Für die Durchführung dieser Untersuchungen waren ausführliche methodische Arbeiten notwendig.

Die radioaktive Markierung viraler Proteine wurde mit dem Nuklid ^{75}Se, einem Gammastrahler, durchgeführt, das anstelle des Schwefelatoms in die Aminosäure Methionin eingebaut ist.

Die bei der Verwendung von Sucrose als Dichtemedium auftretende Labilität des VHS-V und insbesondere des SVC-V konnte durch die Verwendung von Percoll- beziehungsweise Metrizamidgradienten beseitigt werden.

Zur Analyse der in der limitierten Proteolyse erhaltenen Peptidmuster der viralen Proteine wurde ein neues Polyacrylamidgradienten-Gelsystem, das Doppelgradienten-Gel, entwickelt. Dieses System liefert im Molekulargewichtsbereich von 94kd bis 2350d eine saubere Auftrennung der Proteine.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahne, W. 1981. Serological techniques currently used in fish virology. Develop. biol. Standard. 49:3-27.
2. Anonym, a, Bundesgesetzblatt I., (1980):386.
3. Anonym, b, Bundesgesetzblatt I., (1982):382.
4. Anonym, c, Bundesgesetzblatt I., (1982):385.
5. Bachmann, K. 1970. Messung radioaktiver Nuklide, Bd. 2, Verlag Chemie, Stuttgart.
6. Békési, L. and Edith Stabó. 1979. A Rhabdovirus isolated from carps in Hungary. Experimental infection of carps and resistance of the virus. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 26:193-197.
7. Bellet, R. 1958. Du syndrome entéro-hepto-renal chez la truite arc-ciel de pisciculture. Bull. Fr. Piscic. 189:113.
8. Birnie, G.D., D. Rickwood and A. Hell. 1973. Buoyant densities and hydration of nucleic acids, proteines and nucleoprotein complexes in metrizamide. Biochimica et Biocphysica Acta, 331:283-294.
9. Brewer, J.M., A.J. Pesce und R.B. Ashworth. 1977. Experimentelle Methoden in der Biochemie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 120-135.
10. Bussereau, F., P. De Kinkelin and Monique le Berre, 1975. Infectivity of Fish Rhabdoviruses for Drosophila melanogaster. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 126A:389-395.
11. Clerx, A. 1978. Comparative protein analysis of non-salmonid fish rhabdoviruses. J. gen. Virol. 40:287-295.
12. Clerx, A. 1981. Persönliche Mitteilung.
13. Cleveland, D.W., S.G. Fischer, M.W. Kirschner and U.K. Laemmli. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 252:1102-1106.

14. Copper, T.G. 1981. Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin, New York: 188-190.
15. Cox, J.H. 1982. The structural proteins of Rabies Virus. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. Vol. 5, Nos. 1-3:21-25.
16. De Kinkelin, P. 1972. Rhabdovirus des pissons II. Ann. Microbiol. 125A:113-124.
17. Deuter, A. 1981. Untersuchungen über die Proteinstruktur und physikalisch-chemische Eigenschaften von zwei fischpathogenen Rhabdoviren (VHS-V und RVC), Diplomarbeit, Universität Tübingen.
18. Drapeau, C.R., V. Boily and J. Houmard. 1972. Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus aureus. J. Biol. Chem. Vol. 247:6722-6726.
19. Emerson, S., and R.R. Wagner. 1973. L-Protein requirement for in vitro-RNA-synthesis by vesicular stomatitis virus. J. Virol. 12:1325-1335.
20. Enzmann, P.J. and F. Weiland. 1978. Structural similarities of Hog Cholera Virus with Togaviruses. Arch. of Virol. 57:339-348.
21. Enzmann, P.-J. 1980. Persönliche Mitteilung.
22. Enzmann, P.-J. 1981. Persönliche Mitteilung.
23. Enzmann, P.-J., B. Maier and K. Bigott. 1981. Biochemical Data on the RNA of VHS-V and RVC indicating a possible serological relationship. Bull. Eur. Ass. Fish Pathologists: 37-39.
24. Enzmann, P.-J., A. Deuter, B. Maier. 1981. Isolation and characterisation of the RNP's of two fishpathogenic rhabdoviruses (VHS-V and RVC). Med. Microbiol. Immunol. 169:143.
25. Enzmann, P.-J. 1982. In vivo labelling of viral proteins with 75 Selenomethionine. J. of Virol. Methods. 5:243-246.

26. Fijan, N.N., Z. Petriniec, D. Sulimanovic and L.B. Zwillenberg. 1971. Isolation of the viral causative agent from acute from of infectious dropsy of carp. Vet. Archiv. 41:125-138.
27. Ghittino, P. 1967. La setticemia emorragia virale (SEV) della trotta iridea die allevamento. Riv. ital. Piscic. Ittopat. 2:90-102.
28. Gocke, D.J. and C. Howe. 1970. Rapid detection of Australia antigen by counter immunelektrophoresis. J. Immunol. 104:1031-1032.
29. Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.S. Glover. 1963. The preparation of ^{131}|I|-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89:114-123.
30. Griffith, D.M. 1976. Techniques of preparative zonal and continuous flow ultracentrifugation. Application Research Department Spinco Division, Beckman Instruments, Inc., 2nd ed.
31. Hedrick,J.L. and A.J. Smith. 1968. Size and charge isolmer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126:155-164.
32. Hill, J. 1975. Physico-chemical and serological characterization of five Rhabdoviruses infecting fish. J. gen. Virol. 24:433-445.
33. Horzinek, M. 1975. Kompendium der allgemeinen Virologie. Pareys Studientexte, Bd. 4.
34. Hughes, W.L. 1966. Chemical requirements of a satisfactory label. In: Labeled Proteins in Tracer Studies, European Atomic Energy Community: 3-6.
35. Jensen, M.H. 1963. Preparation of fish tissue cultures for virus research. Bull. Off. Int. Epiz. 59:131-134.
36. Ketzdy, F.J., L. Lorand and K.D. Miller, 1965. Titration of active centers in thrombin solutions. Standardization of the enzyme. Biochemistry, 4, No, 11:2303-2308.

37. Klingler, K. 1957. Septikämie bei Regenbogenforellen. Schweiz. Fischereiztg. 67:300.
38. Klingler, K. 1958. Forellenfütterung und "neue Krankheit" (infektiöse Nierenschwellung und Leberdegeneration) der Regenbogenforelle, Allg. Fischereiztg. 33:12-14; 27-30.
39. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
40. Lambin, P., D. Rochu and J.M. Fine. 1976. A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. Anal. Biochem. 74:567-575.
41. Langone, J.J. 1982. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. J. of Immun. Meth. 55:277-296.
42. Laurell, C.B. 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Chem. 15:145.
43. Lenoir, G. 1973. Structural proteins of SVC. Biochem. Biophys. Res. Com. 51:895-899.
44. Lenoir, G. and P. de Kinkelin. 1975. Fish Rhabdoviruses. Comparative study of protein structure. J. Virol., Vol. 16, No. 2:259-262.
45. Lieser, K.H. 1969. Einführung in die Kernchemie, Bd. 1, Verlag Chemie, Stuttgart.
46. Matthews, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. fourth report of the international committe on taxonomy of viruses. Intervirology, 17:109-114.
47. Maurer, H.R. 1971. Disc elektrophoresis and related techniques of polyacrylamide-gel-electrophoresis. De Gruyter, Berlin, New York, 2nd ed.
48. McAllister, P.E. and R.R. Wagner. 1975. Structural proteins of five salmonid Rhabdoviruses. J. Virol. 15:733.

49. McSharry, J.J. and R.R. Wagner. 1971. Carbohydrate compositions of VSV. J. Virol. 7:412-415.
50. Meier, W. and P.E.V. Joergensen. 1980. Isolation of VHS-Virus form Pike fry (Esox lucius) with hemorrhagic symptoms. In: Fish Diseases, ed. W. Ahne, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York:8-17.
51. Ornstein, L. and B.J. Davis. 1962. Preprint by distillation industries, Eastman Kodak Co., Disc Elektrophoresis.
52. Pfeil-Putzien, C. 1978. Experimentelle Übertragung der Frühjahrsvirämie (spring viraemia) der Karpfen durch Karpfenläuse (argulus foliaceus). Zbl. Vet. Med. B, 25:319-323.
53. Pharmacia. Percoll, Methodology and applications. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.
54. Repik, P. 1980. Adsorption, penetration, uncoating and the in vivo m-RNA-transcription in rhabdoviruses. Vol. II. Bishop, P.H.L., CRC Press, INC.
55. Roy, P. and J.P. Clewley. 1978. Spring viremia of carp virus RNA and virion associated transcriptase activity. J. Virol. 25:912.
56. Rudikow, N.I. 1975. Spring viraemia in fish. Veterinarija (Mosc) 6:64-66.
57. Schäperclaus, W. 1938. Die Schädigung der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. Allg. Fischereiztg. 41:256.
58. Schäperclaus, W. 1954. Fischkrankheiten. 3. Aufl. Akademie Verlag, Berlin.
59. Schäperclaus, W. 1979. Fischkrankheiten. Teil 1. Akademie Verlag, Berlin.
60. Schlegel, H.G. 1974. Allgemeine Mikrobiologie, 3. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart: 177.
61. Schwöbel, W. und V. Siedentopf. 1961. Charakterisierung eines 3 Jahre alten Zellstammes aus der Schweineniere und Untersuchungen über sein

Verhalten gegenüber dem Virus der Maul- und Klauenseuche. Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. 181:3-16.

62. Shapiro, A.L., E. Vinuela and J.V. Maizel. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. biophys. Res. Commun. 28:815-820.
63. Sokol, F. 1974. Structural phosphoproteins associated with 10 Rhabdoviruses. J. gen. Virol. 24:433-445.
64. Tomasec, I. and N.N. Fijan. 1965. The etiology of infectious dropsy of carp. Ann. N.Y. Acad. Sci. 126:606.
65. Wagner, R.R. 1972. Classification of Rhabdovirus protein: A proposal. J. Virol. 27:369-378.
66. Wagner, R.R. 1975. Reproduction of Rhabdoviruses. In: Comprehensive Virology, ed. Frankel-Conrat and R.R. Wagner, Plenum Press, New York, Vol. 4:1-93.
67. Wittmann, G. and J. Jakubik. 1979. Colostral immunity in piglets from sows vaccinated with inactivated Aujeszky disease virus vaccine. Arch. Virol., 60:33-42.
68. Wizigmann, G. Ch. Baath und R. Hoffmann. 1980. Isolierung des Virus der viralen hämorrhgischen Septikämie (VHS) aus Regenbogenforelle-, Hecht- und Äschenbrut. Zbl. Vet. Med. B., 27:79-81.
69. Zwillenberg, L.O., M.H. Jensen and H.H.L. Zwillenberg. 1965. Electron microscopy of the virus of viral hemorrhagic septicaemia of rainbow trout (Egtved virus). Archiv Gesamte Virusforschung, 17:1-19.
70. Zwillenberg, L.O., and H.H.L. Zwillenberg. 1968. Transmission and recurrence problems in viral hemorrhagic septicaemia of rainbow trout. Bull. Off. Int. Epiz. 69:969.

Lebenslauf

Axel Deuter
geboren am 20. November 1950
in Gelsenkirchen
seit dem 6. August 1981
verheiratet mit
Margaret Ann Jackson M.A.

Schulbesuch:

1957 - 1961	Evgl. Volksschule, Gelsenkirchen
1961 - 1966	Realschule für Jungen, Gelsenkirchen

Lehre:

1966 - 1970	Chemielaboranten-Lehre bei den Chemischen Werken Hüls in Marl mit erfolgreichem Abschluß am 21. Mai 1970

Fachhochschulausbildung:

Okt. 1970 - Okt. 1973	Studium der Fachrichtung Chemie and der Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
8. Okt. 1973	Erlangung des akademischen Grades Ingenieur (grad.) im Fachbereich Chemie

Bundeswehr:

1974 - 1975	Ableistung des Wehrdienstes bei der Luftwaffe in Goslar und Delmenhorst

Hochschulausbildung:

Okt. 1975 - Okt. 1977	Studium der Fachrichtung Biologie an der Universität Bielefeld
3. Okt. 1977	Erfolgreiche Diplom-Vorprüfung an der Universität Bielefeld
Okt. 1977- Juni 1980	Studium der Biologie (Mikrobiologie) an der Universität Tübingen
Feb. 1980 - Mai 1981	Anfertigung einer Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie an der

	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen
1. Juni 1981	Zeugnis über die Diplomprüfung als Biologe an der Universität Tübingen
Juni 1981 - Juli 1984	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen. Im Rahmen dieser Tätigkeit Erstellung einer Dissertation über das Thema "Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an zwei fischpathogenen Rhabdoviren (VHS-V und SVC-V)" unter Anleitung von Frau Prof. Dr. E. Sander und Dr. P.-J. Enzmann.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bielefeld:

G. Braun, P. Görner, J. Hinze, K. Immelmann, K. Kowallik, B. Krebs, G. Michaelis, P. v. Sengbusch, Chr. Siebeneicher, P. Sossinka.

Tübingen:

V. Braun, K. Hantke, P. Hausen, C. Pelling, Frau E. Sander, W. Seyffert, D. Sperlich, G. Weitzel, P. Wenk, H. Zähner.